

인공피부 개발을 위한 생체 적합성 지지체에 관한 연구

김창환^{1,2}, 김천호¹, 박현숙¹, 강현주¹, 한은숙¹, 김윤영¹,
최영주¹, 이수현¹, 최태부², 손영숙¹

한국 원자력 연구소 부설 원자력병원 생체조직재생 연구실¹,
건국대학교 미생물공학과²

전화 (02) 970-1319, FAX (02) 977-0381

Abstract

Chitosan scaffold is widely applied to drug delivery and tissue engineering. We have developed chitosan scaffolds, with various pore size, by differing freezing temperature and duration of ultraviolet (UV) irradiation, for reconstructing skin equivalent. Chitosan scaffold was coated with type I collagen, fibronectin and basic fibroblast growth factor (bFGF) in various combinations and concentrations, to evaluate the effect of extracellular matrix (ECM) and bFGF on cell adhesion, growth and differentiation of dermal fibroblasts. Human dermal fibroblasts, isolated from newborn foreskin and passaged between 3 and 5, were seeded on the top of scaffolds and cultivated for 2 weeks. We examined the morphology and the secretion of ECM of fibroblasts using scanning electron microscopy (SEM) and histochemistry. A stellate morphology of fibroblasts were seen in all groups. The scaffold coated with either type I collagen and bFGF or type I collagen and fibronectin, however, showed the best condition of dermal fibroblasts, in that the highest cell number and ECM secretion were seen. On the contrary, scaffolds coated with all three factors, type I collagen, bFGF and fibronectin, showed lower number of cells and ECM secretion than scaffolds with two factors. There was a tendency of dose-dependence in all three factors for fibroblast growth and ECM secretion. In conclusion, we may suggest that chitosan scaffold coated with either type I collagen/bFGF or type I collagen/fibronectin could provide more favorable environment for the growth and differentiation of dermal fibroblasts.

서론

중증화상의 경우 생명에 심각한 위협을 초래할 수 있고, 상처 치유 후에도 심한 흉터가 남을 수 있기 때문에 빠르고 완전한 상처 치료를 위해 인공피부의 이식을 필요로 한다. 이러한 인공피부를 생체 밖에서 만들기 위해서는 크게 두 가지 요소가 필요한데, 첫째는 피부를 구성하는 세포이고 둘째는 조직의 뼈대 역할을 할 수 있

는 지지체이다. 위와 같은 구성 요소 중, 지지체는 생체 적합성과 생분해성을 가져야 하며, 진피층을 구성하는 섬유아세포가 잘 부착하고 증식할 수 있어야 한다. 최근 이러한 지지체에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으나, 합성물질을 사용하는 경우 특히 생체 적합성이 떨어지며, 천연물질인 collagen을 사용하는 경우는 수축 현상을 나타내는 단점을 나타낸다.

따라서 본 실험에서는 천연물질인 키토산을 이용하여 지지체를 만들고 세포의 부착력과 증식을 돕기 위해 type I-p collagen과 bFGF 또는 fibronectin을 농도별로 함께 코팅한 후, 섬유아세포를 점착시키고 배양하여 세포의 증식 정도를 비교하여 보았다. 이 때, 사용한 키토산은 계겉질의 추출물로 생체 적합성, 생분해성, 그리고, 항균성등의 장점을 갖고 있으며¹⁻², type I-p collagen은 진피층을 이루는 주요한 extracellular matrix(ECM) 성분으로 섬유아세포의 부착과 증식을 향상시킨다. 또한 fibronectin과 bFGF는 섬유아세포의 부착과 증식을 도울 뿐만 아니라, 실제 화상치유의 초기와 중기 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.³⁻⁵

재료 및 방법

본 실험에 사용한 섬유아세포는 신생아의 포피조직(foreskin)으로부터 분리하여 사용하였다. 즉, foreskin을 표피층과 진피층으로 분리한 후, 2mg/ml collagenase를 이용하여 진피층으로부터 섬유아세포를 분리하여, 10% FBS가 들어있는 DMEM:F12(3:1) 배지를 이용하여 배양하며 사용하였다.

키토산 지지체는 1% acetic acid에 2% w/v이 되도록 키토산을 녹인 후, 10× media(DMEM:F12=3:1)와 reconstruction buffer(NaHCO₃ 2.2g, 4.77g HEPES (200mM)/100ml 0.05N NaOH)를 각각 키토산 용액의 10%가 되도록 첨가하여 중화한 다음, 얼리는 온도와 U.V. 조사 시간을 다르게 하며 제작하였다. 각 조건에 따라 만들어진 키토산 지지체는 주사식 전자 현미경(SEM)을 통해 pore size를 확인하여 섬유아세포가 부착 및 증식이 가능한 지지체의 조건을 선택하였다. 최종적으로 선택된 조건에 따라 키토산 지지체를 만든 후, 섬유아세포의 부착 및 증식을 향상시키기 위해 type I-p collagen과 bFGF 또는 fibronectin을 함께 또는 세 물질을 모두 같이 키토산 지지체에 코팅하여 보았다. 이 때, 코팅에 사용한 type I-p collagen의 농도는 0.1%, 0.05%, 0.01%였고, bFGF와 fibronectin의 농도는 각각 150ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml이었다. 각 방법으로 제작한 키토산 지지체는 섬유아세포를 1.6×10^5 cells/scaffold의 농도로 점착시킨 후, 일정시간 배양하여, 부착 및 증식 정도를 SEM과 조직 염색(H & E staining)으로 확인하였다.

결과 및 고찰

얼리는 온도와 U.V. 조사 시간을 다르게 하며 키토산 지지체를 만들어 pore size를

확인한 결과, 얼리는 온도를 -70°C 로 하고, U.V.를 지지체의 각 면에 대해 2시간씩 조사했을 때, $150\sim 200\mu\text{m}$ 의 pore size를 갖는 지지체가 만들어졌다(fig. 1).

지지체에 collagen과 bFGF 또는 fibronectin을 농도별로 함께 또는 세 가지 물질을 같이 코팅하여 *in vitro*에서 섬유아세포를 부착 및 배양한 결과, collagen만 단독으로 코팅한 경우보다는 bFGF 또는 fibronectin을 함께 코팅했을 때, 세포의 증식 정도와 ECM의 생성 정도가 증가하였다(fig. 2). 또한 코팅 농도가 증가함에 따라 세포의 증식 및 ECM 생성이 증가함을 알 수 있었다. 그러나, 세 가지 물질을 모두 코팅한 지지체에서는 세포의 증식 및 ECM 생성이 type I-p collagen과 bFGF 또는 fibronectin을 함께 코팅한 경우보다 적었다.

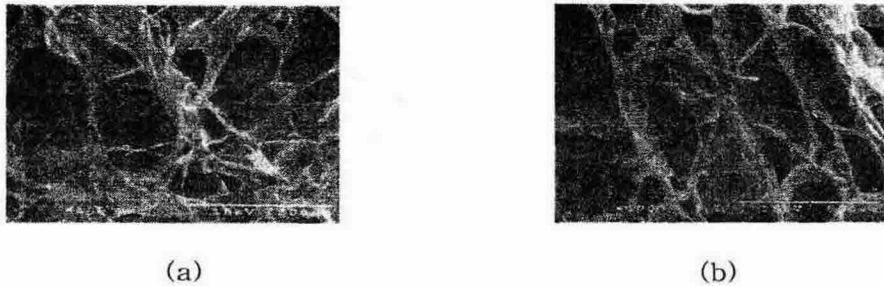


Fig. 1. SEM of neutralized chitosan scaffold (magnification : $\times 100$)
 ; freezing temp. : -70°C ,
 ; time of UV irradiation : 2hr/each side of chitosan scaffold
 (a) : surface of scaffold, (b) : cross-section of scaffold

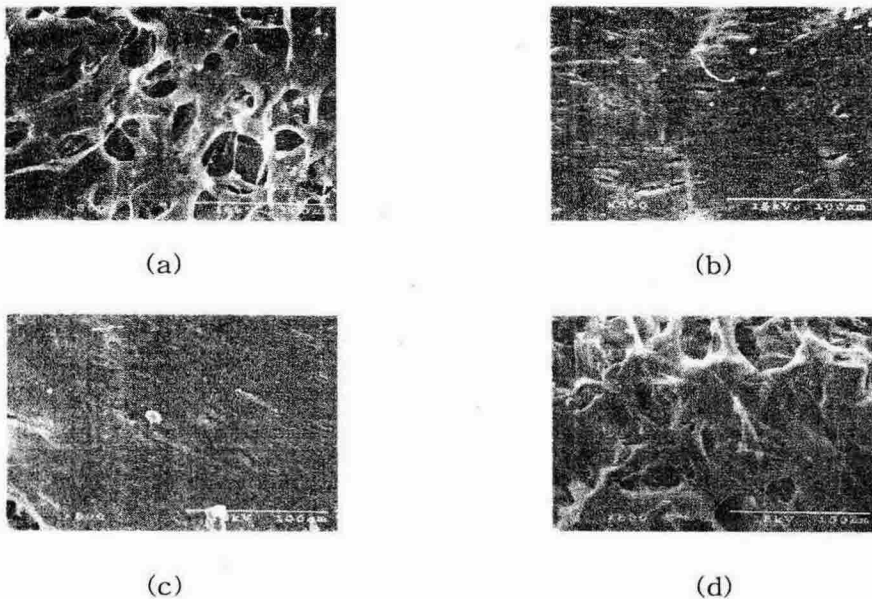


Fig. 2. SEM of cell-seeding chitosan scaffold coated with type I-p

collagen and bFGF or fibronectin (magnification : $\times 500$)
; culture period of human fibroblast : 2 weeks ; surface of scaffold
(a) : 0.1% type I -p collagen coating scaffold
(b) : 0.1% type I -p collagen and 150ng/ml bFGF coating scaffold
(c) : 0.1% type I -p collagen and 150ng/ml FN coating scaffold
(d) : 0.1% type I -p collagen, 150ng/ml bFGF and
150ng/ml FN coating scaffold

요약

생체 적합성, 생분해성, 항균성 등의 특징을 갖는 키토산 지지체는 type I -p collagen과 bFGF 또는 fibronectin을 함께 코팅함으로써 세포적합성을 향상시켜 섬유아세포의 증식과 ECM의 분비를 증가시킬 수 있으며, 인공피부를 위한 적합한 지지체로 사용될 수 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Biagini G, Bertani A, Muzzarelli R, et al., "Biomaterials"(1991), 12, 281-6
2. Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W. and Goosen, M.F.A., "J. Bioact. Comp. Polymers."(1992), 7, 370-397
3. McGee GS, Davidson JM, Buckley A, et al., "J. Surg. Res."(1988), 45, 145-53
4. Klingbeil CK, Cesar LB, Fiddes JC., "Prog. Clin. Biol. Res."(1991), 65, 443-58
5. Mellin TN, Cashen DE, Ronan JJ, Murphy BS, DiSalvo J, Thomas KA
"J. Invest. Dermatol."(1995), 104(5), 850-5.