대한성형외과학회지. 제 33 권, 제 1 호
J Korean Soc Plast Reconstr Surg
Vol. 33, No. 1, 1 - 4, 2006

골수기질세포 및 섬유아세포의 창상치유 촉진 성장인자 분비능 비교

김세현 · 한승규 · 윤태환 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Comparison of Bone Marrow Stromal Cells with Fibroblasts in Wound Healing Accelerating Growth Factor Secretion

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

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

Cryopreserved fibroblast implants represent a major advancement for healing of chronic wounds. Bone marrow stromal cells, which include the mesenchymal stem cells, have a low immunity-assisted rejection and are capable of expanding profoundly in a culture media. Therefore, they have several advantages over fibroblasts in clinical use. The ultimate goal of this study was to compare the wound healing accelerating growth factor secretion of the bone marrow stromal cells with that of the fibroblasts and this pilot study particularly focuses on the growth factor secretion to accelerate wound healing. Bone marrow stromal cells and fibroblasts were isolated from the same patients and grown in culture. At 1, 3, and 5 days post-incubating, secretion of basic fibroblast growth factor(bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and transforming growth factor beta(TGF-β) were compared. In TGF-β secretion fibroblasts showed 12~21% superior results than bone marrow stromal cells. In contrast, bFGF levels in the bone marrow stromal cells were 47~89% greater than that in fibroblasts. The VEGF levels of the bone marrow stromal cells was 7~12 fold greater than that of the fibroblasts. Our results suggest that the bone marrow stromal cells have great potential for wound healing accelerating growth factor secretion.

Received August 31, 2005
Revised November 4, 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 제 57차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 구연 발표되었음.

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

Key Words: Bone marrow cells, Fibroblasts, Growth substances, Wound healing

I. 서 론

만성창상은 그 치료가 어렵고, 통상적인 치료방법에 잘 반응하지 않는다. 최근 당뇨족과 같은 만성창상의 치료를 위해 국소적으로 성장인자를 이용하는 시도가 많은 관심을 끌고 있지만, 그 효과는 전반적으로 두드러지지 않는 게 사실이다.[1,2] 만성창상에 성장인자를 공급해주기 위한 또 다른 노력으로, 창상환경을 조절할 수 있고 만성창상에 부족한 성장인자 및 다른 필요 요소들을 분비할 수 있는 냉동보존 섬유아세포 이식이 생물학적 치료목적으로 개발되었다.[3]

골수기질세포는 간엽줄기세포가 주된 구성성분으로 뼈, 연골, 근육, 결합조직 등의 전구체 역할을 하고,[4] 면역학적으로는 거부반응이 적고, 세포자멸사 없이 분할하는 능력이 뛰어난 특징이 있다.[5] 그래서 골수기질세포는 생명공학 분야에서 관심의 대상이 되고 있다. 하지만 창상치유에 골수기질세포를 이용한 연구는 아직 발표된 바 없다.

저자들은 지난 연구에서 창상치유측면 중 세포증식 및 교원질 합성에서 골수기질세포가 섬유아세포보다 우월함을 규명한 바 있다.[6] 이의 연장선상에서 본 연구는 섬유아세포 및 골수기질세포에서 분비되는 창상치유 촉진 성장인자를 비교, 분석하여 골수기질세포가 섬유아세포보다 성장인자 분비능에 있어서도 우수한지 규명하는 데 목적이 있다. 특히 만상창상치유에 부족하고 창상치유에 핵심적인 성장인자인 TGF-β, bFGF, VEGF의 분비능을 비교하였다.[7]

II. 재료 및 방법

가. 섬유아세포 및 골수기질세포의 분리 및 배양

20세에서 38세 사이의 6명의 건강한 남자 환자에게서 연구에 필요한 세포를 채취하였다. 채취 전에 환자에게 연구에 대한 충분한 설명을 하였고, 이에 동의를 얻었다. 섬

유아세포는 환자의 진피에서, 골수기질세포는 환자의 골수로부터 얻었다.

섬유아세포의 채취는 우선 환자들의 피부조직에서 표피를 제거한 후 진피만을 얻은 후 약 2 mm 정도 크기로 잘게 나누어 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℃ 조건에서 4시간 동안 보관하여 배양용기에 진피조직을 부착시켰다. 이후 25 μg/ml gentamycin과 10% FBS를 포함한 DMEM/F-12 12 ml를 추가하여 배양을 시작하였다. 모든 배양과정에서 5% CO_2, 100% 습도, 37℃가 유지되도록 하였다. 충분한 양이 배양되면 trypsinization으로 세포들을 유리한 후, 유리된 세포들은 Dulbeccos's phosphate buffered saline(DPBS; GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.)으로 2.7배 희석한 후 17분 동안 450 × g의 속도로 원심 침전법을 시행하여 모집하였다. 이를 다시 DPBS로 두 번 세척하고 재 부유시킨 후 100 μm의 nylon mesh를 이용, 여과하여 추출하였다. 세포의 밀도는 hemocytometer를 이용하여 trypan blue dye exclusion 방법을 이용하였다. 그리고 이렇게 추출된 세포는 3회 계대배양하여 총 1.8×10^5개의 세포를 얻었으며 이 중 5.0×10^3개를 추출하여 본 실험에 사용하였다.

골수기질세포의 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 solution 을 첨가하고 실온 2,500 × g에서 30분간 원심분리 하였다. 분리된 골수 표본 중 밀도상층의 단핵구층을 취하여 배양을 시작하였다. 배양액, 배양과정 및 계대배양 등 모든 조건은 진피 섬유아세포 때와 동일하게 시행하였다.

각각의 세포는 96 well 배양기에 각 well당 5% 태아우 성장액을 함유하는 DMEM/F-12 배지 200 $\mu\ell$에 5.0×10^3 cells/well의 밀도로 첨가된 후 5% CO_2, 100%의 습도, 37℃에서 배양되었다. 배양 후 1, 3, 5일째에 창상치유과정에서 핵심적인 성장인자인 TGF-β, bFGF, VEGF 농도를 측정하였다. 성장인자 농도 측정 시 5% 태아우혈청에 함유된 기본적인 성장인자 농도를 감하여 순수한 세포분비의 성장인자 수치만을 측정하였다.

나. 성장인자의 측정

TGF-β, bFGF, VEGF 성장인자의 측정은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D systems, Minneapolis, MN, U.S.A.) 방법을 이용하였다. 제조사의 설명서에 따라 검체 및 기준표본은 일정하게 희석하여 각각의 희석액을 첨가한 뒤 각각의 포획항체(capturing antibody)가 입혀진 각각의 well에서 실온정치 하였다. 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 고정액을 넣은 후 일정파장에서 ELISA reader 기기를 이용해 색의 강도를 측정하였다.

다. 통계처리

각각의 배양시기에 따라 각각의 배양용기의 성장인자 측정값을 위해 모든 실험은 6회 반복하였으며, 평균값을 구하여 그 시기의 측정치로 사용하였다. 평균값에 대한 통계처리는 Mann-Whitney U-test 방법을 이용하여 $p<0.05$에서 유의성을 분석하였다.

III. 결 과

첫째, TGF-β의 경우, 섬유아세포에서 배양 1, 3, 5 일째에 평균값이 각각 616 ± 25, 1151 ± 82, 1608 ± 69 ng/ml 이었으며 골수기질세포에서는 각각 546 ± 38, 1026 ± 68, 1320 ± 100 ng/ml로 섬유아세포에서 12 - 21% 정도 높은 수치를 보였다($p<0.05$)(Fig. 1). 둘째, bFGF의 경우, 섬유아세포에서 배양 1, 3, 5 일째에 평균값이 각각 11 ± 1.0, 18 ± 1.7, 26 ± 4.1 pg/ml이었으며 골수기질세포에서는 각각 16 ± 0.5, 35 ± 3.8, 45 ± 5.3 pg/ml로 골수기질세포에서 47 - 89% 정도 높은 수치를 보였다($p<0.05$)(Fig. 2). 셋째, VEGF의 경우, 섬유아세포에서 배양 1, 3, 5 일째에 평

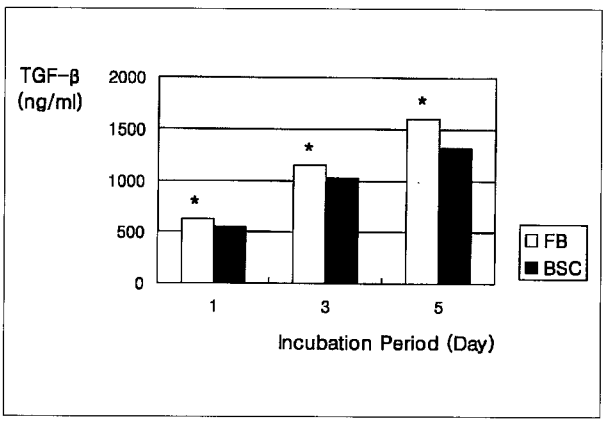

Fig. 1. Levels of transforming growth factor beta (TGF-β) in fibroblasts (FB) and bone marrow stromal cells (BSC) at day 1, day 3, and day 5 post-incubating. The TGF-β levels in the fibroblasts were 12 - 21% greater than that in the bone marrow stromal cells(*: $p<0.05$).

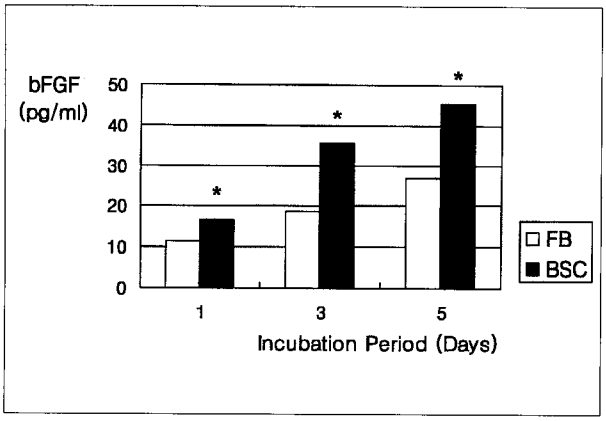

Fig. 2. Levels of basic fibroblast growth factor(bFGF) in fibroblasts (FB) and bone marrow stromal cells(BSC) at day 1, day 3, and day 5 post-incubating. The bFGF levels in the bone marrow stromal cells were 47 - 89% greater than that in fibroblasts(*: $p < 0.05$).

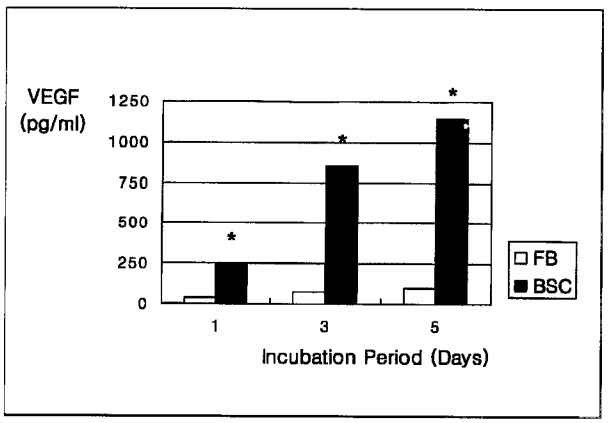

Fig. 3. Levels of vascular endothelial growth factor(VEGF) in fibroblasts(FB) and bone marrow stromal cells(BSC) at day 1, day 3, and day 5 post-incubating. The VEGF levels of the bone marrow stromal cells was 7~12 fold greater than that of the fibroblasts(*: $p<0.05$).

균값이 각각 37 ± 6.3, 73 ± 8.0, 98 ± 7.4 pg/ml이었으며 골수기질세포에서 각각 247 ± 29, 855 ± 85, 1145 ± 89 pg/ml로 골수기질세포에서 무려 7 - 12배 정도 높은 수치를 보였다($p<0.05$)(Fig. 3). 즉 측정한 3가지 성장인자 중에서 골수기질세포는 섬유아세포에 비해 bFGF와 VEGF 분비에서 뚜렷하게 우수하였다.

IV. 고 찰

창상치유 과정은 세포의 증식과 이동, 신생혈관생성, 세포외기질의 침착 등이 관여하는 복합적이고 역동적인 과정이다. 이러한 창상치유과정의 결함은 창상치유를 지연시켜 만성창상에 이르게 한다. 만성창상에서는 창상치유에 핵심적인 성장인자들이 부족하며 특히 TGF-β, bFGF, VEGF의 결핍이 심각한 것으로 알려져 있다.[8]

bFGF는 혈관생성 성장인자로 혈관내피세포의 증식 및 이동을 촉진하고, VEGF의 활성에 영향을 미친다.[9,10] VEGF는 PDGF 계열에 속하는 성장인자로 강력한 혈관생성유도 및 혈관내피세포의 증식을 촉진하고 혈관 투과성을 증가시킨다. 또한 VEGF 는 혈관을 확장시키기도 하고,[11] 세포이동을 촉진하고 세포자멸사(apoptosis)를 억제하는 특징이 있다.[12] TGF-β는 섬유아세포의 증식 및 교원질 합성에 강력한 자극제 역할을 하여, 세포 외 기질의 침착에 중요한 역할을 한다.[9,13]

골수에서 분리할 수 있는 골수기질세포는 간엽줄기세포가 주된 구성성분으로서 분화과정을 거쳐 골아세포, 연골세포, 지방세포, 섬유아세포, 근세포 등으로 분화할 수 있다.[4] 그리고 배양과정에서 20 - 30회 정도의 세포 배가(doubling) 과정을 거쳐도 줄기세포의 성질을 유지하는 특징이 있다.[14] 그러므로 이 같은 특성의 골수기질세포는 세포치료제로서의 잠재력 및 유용성이 뛰어나다 할 수 있다. 배양된 골수기질세포는 여러 사이토카인(cytokine)을 분비한다.[4] 골수기질세포가 VEGF를 어느 정도 분비하는지에 대한 연구는 있지만,[15] 골수기질세포가 섬유아세포와 비교해 볼 때 사이토카인을 얼마나 많이 분비하는지에 대한 연구가 없고, 창상치유증진에서 섬유아세포에 비해 어떤 우월한 능력이 있는지 연구가 없었다. 이 같은 이유에서 두 가지 세포에 대한 비교를 위해 본 연구를 하게 되었다.

본 연구결과 TGF-β 분비에 대해서는 섬유아세포가 우수하였으나 그 차이는 bFGF 나 VEGF 만큼 크지는 않았다. 하지만 bFGF 및 VEGF 분비에 있어서는 골수기질세포가 섬유아세포에 비해 뚜렷하게 우세하였으며, 특히 VEGF에 있어서는 그 차이가 12배에 달했다. VEGF 및 bFGF 는 강력한 혈관생성인자로써 혈관생성은 창상치유에서 결정적인 단계로 특히 만성창상치유에 중요한 과정이다.[16]

저자들이 시행한 이전 연구에 의하면 골수기질세포가 섬유아세포에 비해 창상치유의 과정에서 세포 증식과 교원질 합성능이 우세하였다.[6] 한편 이번 실험결과에 따르면 교원질 합성측면에서 볼 때 강력하게 교원질 합성을 자극하는 TGF-β의 경우 골수기질세포보다 섬유아세포에서 더욱 많이 분비하였다. 골수기질세포가 TGF-β의 분비능이 떨어짐에도 불구하고 교원질 합성능에서 우세한 점으로 미루어 볼 때 교원질 합성에는 TGF-β와 같은 성장인자 이외에도 더 중요한 다른 요소가 관여하는 것으로 생각되며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

앞선 연구와 이번 연구 결과를 종합해 볼 때 생체 외(*in vitro*) 환경에서는 골수기질세포가 섬유아세포에 비해 창상

치유 유도 능력이 훨씬 뛰어나다고 결론 내릴 수 있다. 또한 골수기질세포는 증식능력이 뛰어나고 그런 증식의 과정에서도 안정적인 줄기세포의 성질을 유지하며, 면역관용(immunologic tolerance) 특성이 있어 면역거부반응이 적다는 장점이 있다.[7] 그러므로 골수기질세포는 세포치료제로의 유용성 및 잠재력이 충분하다 할 수 있다. 하지만 생체 내(*in vivo*) 환경에서 창상치유는 여러 인자들이 관여하는 복잡한 과정이다. 그렇기 때문에 골수기질세포가 창상치유의 전 과정에서 뛰어난 효과를 낸다고 단언하기는 어렵다. 그렇기에 앞으로는 생체 내 환경에서 창상치유에 대한 골수기질세포의 심화 된 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

섬유아세포와 비교하여 골수기질세포의 창상치유에 있어 중요한 성장인자들의 분비능을 비교해 본 바 TGF-β의 경우는 섬유아세포가 골수기질세포에 비해 약간 우세하였으며, bFGF 및 VEGF의 경우는 골수기질세포에서 훨씬 많은 양을 분비하였다. 특히 VEGF의 경우는 무려 7-12배 우수한 것으로 나타났다. 결국 본 연구결과 창상치유촉진 목적으로 이식 시 골수기질세포는 놀랄만한 잠재력을 가지고 있으며, 현재 세포치료제로 이용되는 섬유아세포를 대치할 수 있는 가능성을 제시하는 바이다.

REFERENCES

1. 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
2. Tsang MW, Wong WKR, Hung CS, Lai KM, Tang W, 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
3. 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
4. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 276: 71, 1997
5. 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
6. Han SK, Yoon TH, Kim WK: Comparison of Human Bone Marrow Stromal Cells with Fibroblasts in Cell Proliferation and Collagen Synthesis. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 32: 343, 2005
7. 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
8. Pierce GF: Inflammation in nonhealing diabetic wounds: the space-time continuum does matter. *Am J Pathol* 159: 399, 2001
9. Belgore F, Lip GYH, Blann AD: Basic fibrobrast growth factor induces the secretion of vascular endothelial growth factor by human aortic smooth muscle cells but not by endothelial cells. *Eur J Clin Invest* 33: 833, 2003
10. Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, Angel MF, Lineaweaver WC: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. *Br J Plast Surg* 56: 653, 2003
11. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E: Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1: 1024, 1995
12. Wilkins BS, Jones DB: Immunohistochemical characterization of intact stromal layers in long-term cultures of human bone marrow. *Br J Haematol* 90: 757, 1995
13. Hansen SL, Young DM, Boudreau NJ: HoxD3 expression and collagen synthesis in diabetic fibroblasts. *Wound Repair Regen* 11: 474, 2003
14. Conget PA, Minguell JJ: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181: 67, 1999
15. Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, Mooney DJ: Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. *Tissue Eng* 9: 95, 2003
16. Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, Peng T, Voelter W, Bucala R, Metz CN: Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis *in vivo*. *FASEB J* 15: 2215, 2001