

녹각교 함유 인공피부를 이용한 피부독성도의 검사

김 잔 디 · 이 해 란 · 정 호 순 · 윤 혜 영 · 백 광 진 · 권 년 수 · 최 혜 령* · 박 경 찬* · 김 동 석[†]

중앙대학교 의과대학 생화학교실, *서울대학교 의과대학 피부과학교실
(2012년 8월 13일 접수, 2012년 10월 19일 수정, 2013년 1월 15일 채택)

Assessment of Skin Toxicity Using Skin Equivalents Containing Cervi cornus Colla

Jandi Kim, Hailan Li, Hyo-Soon Jeong, Hye-Young Yun, Kwang Jin Baek, Nyoun Soo Kwon,
Hye-Ryung Choi*, Kyoung-Chan Park*, and Dong-Seok Kim[†]

Department of Biochemistry, Chung-Ang University College of Medicine,
221 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea.

*Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine

(Received August 13, 2012; Revised October 19, 2012; Accepted January 15, 2013)

요약: 피부 자극과 부식 검사에 사용되는 동물실험을 대체하기 위한 방법으로 인공피부가 개발되어 왔다. 최근에 본 연구진은 녹각교를 함유하는 새로운 인공피부를 구축하였다. 현재 연구에서는 녹각교를 포함하는 인공피부를 사용하여 물질의 독성도 검사를 수행하였다. 그리하여 sodium dodecylsulfate (SDS) 또는 sodium carbonate를 인공피부에 도포하였고 표피의 손상 정도를 H&E와 면역조직화학 염색을 통하여 평가하였다. 인공피부의 표피는 SDS와 sodium carbonate에 의해 농도 의존적으로 영향을 받았다. 더 나아가 이들 물질에 의하여 p63의 발현이 감소하였다. 그러므로 녹각교를 함유하는 인공피부는 동물실험을 대체할 수 있는 모델로써 사용될 수 있고 *in vitro*에서 자극과 부식 검사 시험법의 발전에 도움을 줄 것으로 예상된다.

Abstract: To substitute animal test, skin equivalents (SEs) have been developed for skin irritation and corrosion test. Recently, we have developed new SEs containing Cervi cornus Colla (CCC). In the present study, we used the SEs for cutaneous cytotoxicity test. Sodium dodecylsulfate (SDS) or sodium carbonate was applied to the SEs; and the epidermal damage by H&E and immunohistochemical stains was evaluated. Our results showed that SDS or sodium carbonate affected the epidermal part of SEs containing CCC in a dose-dependent manner and decreased the expression of p63. It is concluded that SEs containing CCC could be used for an alternative model of animal test and would be greatly helpful in the development of *in vitro* irritation and corrosion test.

Keywords: *in vitro* irritation test, non-animal test, cutaneous cytotoxicity, human skin equivalents, Cervi cornus Colla

1. 서 론

피부는 사람의 몸 중 가장 많은 비중을 차지하는 조직이며 외부의 환경으로부터 몸을 보호하는 주요한 역할을 한다. 그렇기 때문에 해로운 물질이나 오염물,

자외선 등에 쉽게 노출된다. 또한, 화장품산업과 의약산업이 크게 발전하고 있고 이와 관련하여 피부에 대한 사람들의 관심 또한 증가하고 있어 미용이나 치료를 목적으로 화장품이나 의약품 등에도 노출된다. 따라서 피부에 직접 도포되는 물질의 수도 많아지며 이에 따라 독성 물질이 피부에 미치는 영향에 대한 검사도 발달되어 왔다.

[†] 주 저자 (e-mail: ds_kim@cau.ac.kr)

피부에 사용되는 물질들은 비면역적 접촉 피부염과 면역적 접촉 피부염, 색소 변화, 면포형성, 발암 반응을 주로 수반한다. 따라서 이와 관련된 독성도 검사가 수행되어 왔다. 피부 독성도 검사는 토끼에서 수행되었던 Draize test[1]를 비롯하여 여러 동물들을 통해서 이루어져 왔으나 윤리적, 사회적, 법적인 이유로 인해 이를 대체할 수 있는 방법들이 개발되고 있다. 특히 최근 유럽연합에서 동물실험을 통과한 원료를 화장품에 사용할 수 없도록 규제함으로써 동물실험을 대체하여 물질의 독성을 확인하는 시험법의 개발이 절실히 요구된다.

동물실험을 대체하는 방법으로는 피부세포를 단층 배양한 후 물질을 처리하여 세포독성을 확인하는 MTT assay가 대표적이다. MTT assay는 살아있는 세포안의 미토콘드리아의 효소들의 활성으로 인해 보라색 formazan이 형성되고 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹여내어 측정하는 방법이다. 하지만 이 방법은 물에 잘 녹는 성분의 물질만을 사용해야 하는 것과 사람의 피부와 다른 환경이라는 제한점을 갖는다[2]. 피부 독성도 검사에서 동물을 대체하는 방법으로 MTT assay 외에 삼차원적으로 배양한 인공피부를 사용하는 방법이 있다. 인공피부는 진피와 표피 그리고 각질층으로 구축되고 물질 처리 시 인공피부 표면에 도포하기 때문에 물에 녹지 않는 성분의 물질도 사용할 수 있으며 피부 표피의 각질층의 구축에 따라 인체피부에 대한 반응을 유사하게 재현할 수 있다는 장점을 가지고 있다[2].

인공피부의 목적은 사람 피부의 구조적, 기능적으로 유사하게 구축하는 것이며 계속해서 발전하고 있다. 앞에서 언급한 것처럼 인공피부의 구축에 있어서 표피의 각질층과 표피와 진피 사이의 기저층의 발현은 중요하다. 진피의 구성성분이 각질층의 발현에 영향을 준다는 것은 잘 알려진 사실이다[3]. 따라서 풍부한 extracellular matrix (ECM)을 포함하는 진피를 만들기 위해 섬유아세포[4], dermal sheath cells (DSCs)[5], mesenchymal stem cells (MSCs)[6]의 세포들을 사용하는 시도가 수행되어 왔다.

녹각은 녹용과 달리 골질화된 사슴의 뿔로 한국에서 한방약제로 쓰인다[7]. 녹각은 16종의 아미노산과 13종의 무기원소를 포함하고 있는 protein polysaccharide이며[8], 이것을 물에 끓여 추출한 것이 녹각교이다.

녹각은 B 세포의 항체 생성 능력을 증가시키며[7], 성장판 내 연골세포 대사를 촉진하는 기능을 갖는다[9]. 피부 진피의 구성성분인 ECM은 proteoglycan을 함유하고 있고 이 proteoglycan의 대부분은 polysaccharide로 이루어져 있다. 따라서 collagen만으로 진피기질을 만드는 것보다 녹각교를 첨가함으로써 진피대체물에 더 풍부한 ECM 환경을 조성해주는 것이라 사료되었다. 따라서 본 연구에서는 표피의 각질화와 기저층의 발달에 도움을 줄 수 있는 진피를 만들기 위해 진피에 녹각교를 첨가하였고, 녹각교 함유 인공피부 모델을 이용하여 실험하였다. 피부 자극물질로는 Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) 가이드라인에서 독성시험물질로 제시한 화합물 중 무기물인 sodium carbonate와 계면활성제인 sodium dodecylsulfate (SDS)의 두 가지를 선정하여 녹각교 함유 인공피부에 대한 자극 정도를 병리조직학적 방법으로 관찰하여 알아보았다. 특히 p63은 암 억제유전자(tumor suppressor gene)인 p53의 동족체로 잠재적인 표피 성체줄기세포의 표식자로 알려져 있으며[10], 표피세포의 성장과 분화를 조절하는 역할을 한다[11]. Involucrin은 표피각질세포의 단백질 전구체 중 하나로 각질형성세포의 분화 표식자이다[12]. 따라서 피부독성도의 평가를 위하여 인공피부에서 p63과 involucrin의 발현에 대한 연구를 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포 배양

사람의 각질형성세포주(HaCaT)는 Cell Lines Service (Eppelheim, Germany)에서 구입하였고, 사람의 섬유모세포주(CCD-25Sk human fibroblasts)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포들은 10%의 fetal bovine serum (FBS), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 스트렙토마이신 및 50 U/mL의 페니실린을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 조건하에서 배양하였다.

2.2. 콜라겐 추출

랫드의 꼬리에서 콜라겐을 함유한 tendon을 뽑아 70% 에탄올에 몇 분 담가놓은 뒤 phosphate buffered saline (PBS)로 옮겨 세척했다. 이후에 tendon의 물기를

일정 정도 뺀 다음 0.1% acetic acid에 넣어 4 °C에서 일주일 동안 교반하여 최종 농도가 10 µg/mL이 되도록 제I형 콜라겐을 추출하였다.

2.3. 녹각교를 함유한 인공피부의 배양

진피 대응물을 만들기 위해 랫드의 꼬리에서 추출한 제I형 콜라겐, 10x 완충액(0.05 N NaOH, 0.26 mM NaHCO₃, 200 mM HEPES), 10x 배지(DMEM : Ham's nutrient mixture F12 = 3 : 1), 5 µg/mL 히알루론산 (Hyaluronic Acid : HA, LG life sciences, Ltd. 한국) 및 0.33 g/mL 녹각교(시원생약(주), 한국)를 준비하였으며, 콜라겐, 10x 완충액, 10x 배지, 히알루론산과 녹각교를 각각 7.5 : 1 : 1 : 0.4 : 0.1의 부피 비율로 혼합하여 진피기질을 만들었다[13]. 진피 대응물은 3 ml의 진피기질에 섬유모세포 3 × 10⁵ cells를 함께 혼합하여 24 mm transwell inserts (Corning, Inc., USA)에 넣어 37 °C에서 젤화하여 만들었다. 인공피부를 만들기 위해 젤 상태인 진피대응물 위에 각질형성세포 1 × 10⁶ cells를 뿌려주고 충분히 잠기도록 배양액을 넣어 1일 배양하였고, 인공피부의 각질형성을 위해 transwell insert 밖에만 배양액을 넣어 13일 동안 공기에 노출하여 배양하였다. 인공피부를 배양액에 잠겨 배양할 때는 1 ng/mL epidermal growth factor (EGF, Invitrogen, corp. USA)를 배양액에 처리하였고, 공기 노출 배양 시에는 10 ng/mL EGF를 처리하였다.

2.4. 자극물질의 도포

14일 배양한 인공피부 위에 농도별 SDS (0.01 ~ 1%)와 sodium carbonate (0.01 ~ 100 µg/mL)를 도포하고 3분 동안 유지한 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하였다. 그리고 나서 37 °C, 5% CO₂의 조건하에 공기 노출하여 16시간 동안 배양하였다.

2.5. 고정 및 면역조직화학염색

배양이 끝난 인공피부조직을 transwell insert로부터 분리하여 10% 포르말린에 24시간 고정한 후 파라핀에 포매하여 블록을 만들었다. 만들어진 파라핀 블록으로 미세절편을 얻어 Hematoxyline-Eosin (H&E) 염색 및 면역조직화학염색을 시행하였다. 면역조직화학염색의 일차 항체로는 p63 (Santa Cruz Biotechnology, USA)과 involucrin (Sigma chemical, USA)을 이용하였

고, 이차 항체로는 anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)를 이용하였다. 면역조직화학 염색은 아비딘-비오틴-과산화효소 복합체 기법(avidin-biotin-peroxidase complex method, UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/DAB, Thermo Scientific, Inc., USA)을 이용하였다.

2.6. MTT Cell Viability Assay

사람의 각질형성세포를 24 well plate에 1 × 10⁴의 밀도로 분주한 후 밤새 배양하였고 24시간 동안 serum starvation을 진행하였다. 이후에 농도별 SDS (0.01 ~ 1%)와 sodium carbonate (0.01 ~ 10 µg/mL)를 물질처리하였고 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂의 조건하에 배양하였다. 배양된 세포의 생존률 측정을 위해 5 µg/mL MTT 용액을 각 well 당 20 ul 분주하고 37 °C에서 4시간 배양한 후 배지를 버리고 DMSO로 보라색 formazan 결정이 녹아 나오도록 10분 동안 교반하였다. 그리고 나서 96 well plate에 100 ul씩 옮겨 담고 540 nm에서 ELISA reader (VERSAMax, Molecular devices, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. 결 과

3.1. 단층배양에서의 세포 생존율 검사

기존의 독성평가 방법으로 주로 사용하는 MTT assay를 이용하여 각질형성세포의 생존율을 관찰하였다. 계면활성제인 SDS는 물리적으로 세포막에 구멍이 생기게 하여 세포독성을 나타낸다. 농도별로 SDS를 처리하고 현미경을 통해 육안으로 관찰했을 때, SDS 0.01%의 농도에서는 대조군과 비교하여 세포의 수가 눈에 띄게 적어진 것을 관찰하였다. SDS 0.05% 이상의 농도에서는 육안으로 관찰하였을 때 물질에 의해 세포막이 녹아서 세포의 수나 morphology를 관찰할 수가 없었다. MTT assay의 결과에서도 SDS를 처리했을 때 대조군과 비교하여 70 ~ 80% 정도의 독성을 관찰하였다(Figure 1A). 한편, 무기화합물인 sodium carbonate를 처리했을 때는 0.1 µg/mL까지의 농도에서는 대조군의 생존율과 거의 비슷하였다. 그러나 1 µg/mL의 농도부터 독성을 보이며 농도가 10 µg/mL 일 때 약 60% 정도의 세포독성이 있는 것을 확인하였다(Figure 1B).

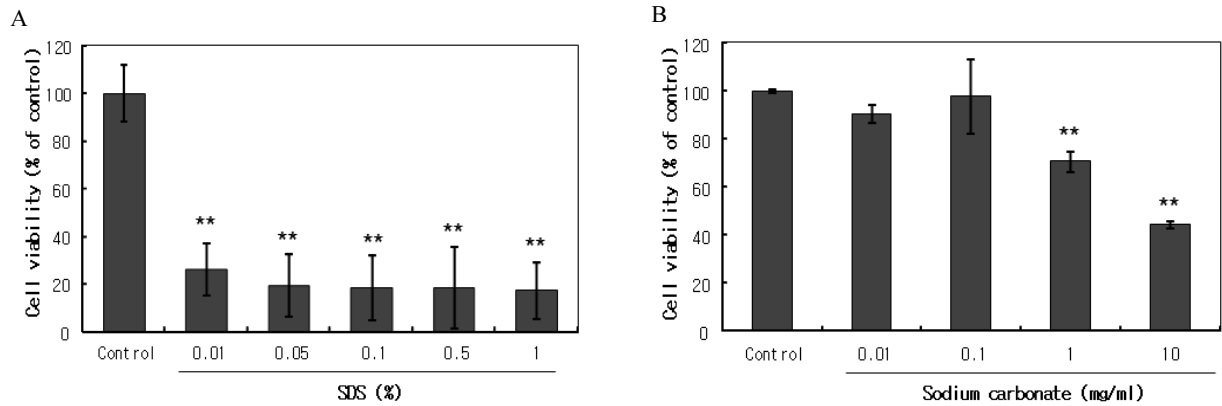


Figure 1. Cytotoxicity test for SDS and sodium carbonate. HaCaT cells were seeded 1×10^4 per well and were starved for 24 hour before treatment of SDS or sodium carbonate. SDS (> 0.01) decreased about 80% of cell viability. Sodium carbonate showed cytotoxic effects in a dose-dependent manner. ** $p < 0.01$ compared to untreated control.

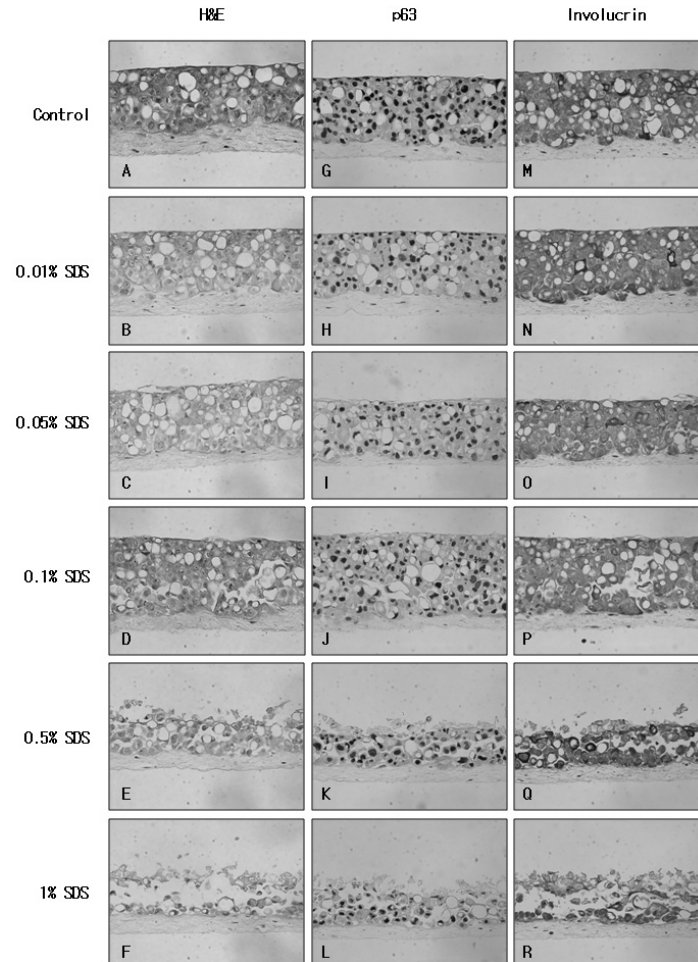


Figure 2. H&E and immunohistochemical staining for toxicity test of SDS. Sections of skin equivalents were hematoxylin/eosin stained and immunostained for p63 and involucrin. Original magnification ($\times 400$).

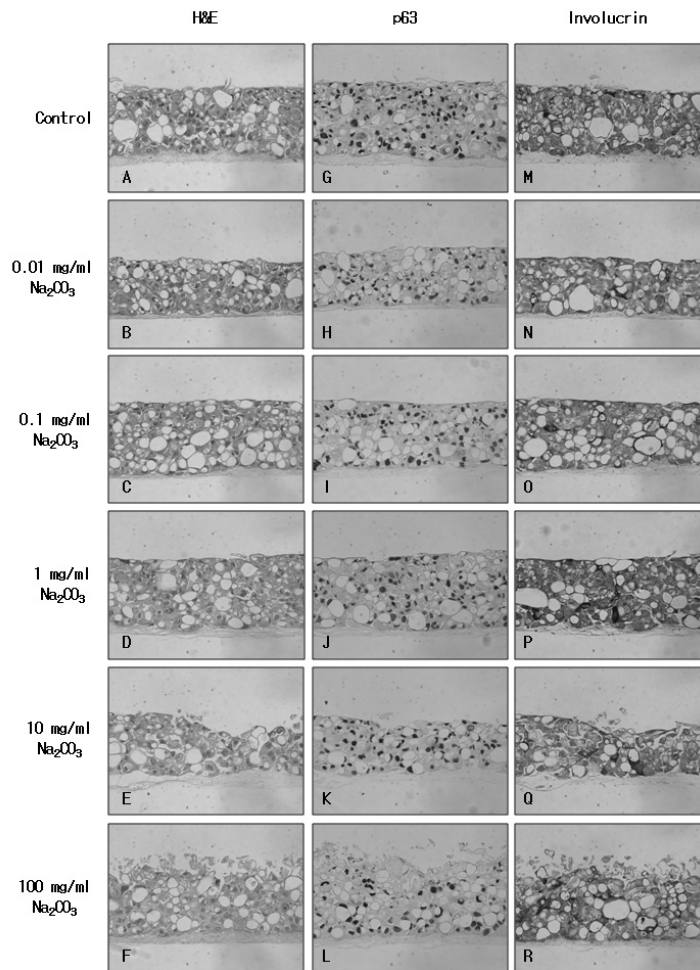


Figure 3. H&E and immunohistochemical staining for toxicity test of sodium carbonate. Sections of skin equivalents were hematoxylin/eosin stained and immunostained for p63 and involucrin. Original magnification ($\times 400$).

3.2. Sodium Carbonate와 SDS가 인공피부에 미치는 영향

녹각교가 함유된 인공피부에 농도별로 자극제를 도포했을 때 인공피부의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 H&E 염색을 진행하였다. 인공피부에 SDS를 가한 경우, 0.05% 이상의 농도에서부터 인공피부의 표피가 농도 의존적으로 손상되는 것을 관찰하였다(Figure 2A-F). SDS의 농도가 0.05%에서는 표피의 중간 중간에서 세포 간의 틈이 생긴 것을 관찰하였으며 0.1%에서는 그 틈이 눈에 띄게 더욱 벌어진 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 0.5%의 농도에서는 표피의 상단부가 떨어져 나갔으며, 1%의 농도에서는 더욱 더 떨어져 나간 것을 관찰하였다. 한편, 녹각교를 함유한 인공피부에 sodium carbonate를 농도별로 자극을 가한 경우에는, 농도가 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 대조군과

비교하여 별다른 차이가 없었다(Figure 3A-D). 그러나 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 표피의 세포 사이가 눈에 띄게 갈라졌을 뿐만 아니라 상단부가 약간 떨어져 나간 것을 관찰할 수 있었고, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 표피 상단부의 세포들이 조금 더 떨어져 나간 것을 관찰하였다(Figure 3E-F).

3.3. Sodium Carbonate와 SDS가 인공피부의 증식과 분화에 미치는 영향

자극제의 도포가 인공피부의 표피세포의 증식 및 분화에 어떠한 영향을 주는지 관찰하기 위해 표피줄기세포의 표식자인 p63과 표피분화세포 표식자인 involucrin의 일차항체를 사용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. SDS를 처리한 결과를 보면 p63과 in-

volucrin이 표피층에 골고루 염색이 된 것을 관찰하였다 (Figure 2G-R). p63에 대한 염색에서 대조군은 SDS를 처리한 군과 비교하여 염색의 정도가 약간 진한 것을 확인할 수 있었으며 염색이 된 핵의 개수 또한 더 많이 관찰할 수 있었다. Involucrin에 대한 염색은 SDS를 처리한 농도와 관련 없이 대조군과 비교하여 차이가 없음을 확인하였다. 또한, sodium carbonate를 처리한 모델에서도 SDS와 비슷한 양상을 보였다. p63과 involucrin이 표피층에 골고루 염색이 되었으며, 대조군과 비교하여 농도와 관련 없이 sodium carbonate를 처리한 군에서 p63의 염색이 호리하게 나타났으며 involucrin의 경우에는 대조군과 비교하여 차이가 없음을 관찰하였다(Figure 3G-R).

4. 고 찰

여러 가지 물질로 인한 피부 독성은 저색소 침착과 과색소 침착을 포함하는 색소 변화, 발암, 면포형성, 면역적 접촉 피부염, 비면역적 접촉 피부염과 같은 피부 반응을 일으키며 이에 관한 피부 독성도 검사가 대부분 *in vivo*에서 수행되어 왔다. 이 중 비면역적 접촉 피부염 반응 검사는 가장 발전되어 왔으며, 토끼의 각막에 자극물질을 도포하여 수행되는 Draize test에서 피부 세포의 2차원적 배양 방법을 통한 검사와 3차원 인공피부를 통한 검사로 이어져왔다. 이러한 발전은 실험실 동물들의 생존권 보호를 위한 대책으로 The U.S. Department of Transportation (DOT)와 OECD의 기구에서 요구되어 왔으며 이와 관련한 가이드라인을 구축해왔다[14]. 또한, 최근에 EU에서는 동물 실험을 통해 실험한 원료를 포함하는 화장품의 판매를 금지하고 있다. 이에 따라 한국에서도 동물실험을 대체할 수 있는 실험실적 검사를 위한 연구가 진행되어 오고 있다.

피부 독성도 검사의 *in vitro* 실험방법으로는 섬유아 세포나 각질형성세포를 이차원 배양하여 물질을 처리한 후 MTT assay 등의 독성 실험을 하는 방법과 인공피부를 구축하여 피부세포를 삼차원으로 배양하여 물질을 처리하는 방법이 있다. 인공피부는 용해되지 않는 물질을 도포하여 처리할 수 있으며 피부와 비슷한 구조로 구축된다는 장점을 가지고 있다. 따라서 독성 실험용 인공피부는 사람의 피부와 구조적, 기능적으로

유사하게 구축되는 것이 중요하다. HaCaT 세포에서의 독성도 검사에서 SDS의 경우 낮은 농도인 0.01%에서부터 높은 독성을 나타내고 있다. 반면에 녹각교 함유 인공피부에서는 0.1%부터 독성을 확인할 수 있다. Sodium carbonate의 경우에는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도부터 농도 의존적으로 세포 독성을 나타내고 있으며 녹각교 함유 인공피부에서는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 이상의 군에서 표피의 손상을 보이는 결과를 나타내고 있다. 단층배양 세포와 인공피부에서의 자극제에 따른 독성도는 약 10배 정도의 차이를 보인다. 이러한 결과는 keratinocyte monolayer culture와 Episkin 상에서 수행했던 결과와 비슷한 양상을 보이며, 이러한 차이는 인공피부의 분화된 표피구조가 기여한다고 보고되어 있다[15].

최근의 연구에서 본 연구진은 녹각교를 첨가한 인공피부를 구축하였다[13]. 녹각교 함유 인공피부는 단층으로 배양하는 성질을 갖는 HaCaT 세포를 사용함에도 불구하고 여러 층으로 표피가 구축되었으며 기저층 또한 잘 발달된 장점을 갖는다[13]. 따라서 본 연구에서는 녹각교가 첨가된 인공피부에 독성도 검사 물질인 SDS와 sodium carbonate를 사용하여 피부 독성도 검사를 실시하였다. 우선, 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서의 생존율 검사는 SDS의 경우 0.01%의 농도에서부터 약 80%의 독성을 보였지만 농도 별로 독성 정도의 차이는 없어 보였다(Figure 1A). Sodium carbonate의 경우에는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 경향을 보였다(Figure 1B).

한편, 녹각교 첨가 인공피부에서 SDS를 처리했을 때, 0.05%의 농도에서부터 농도 의존적으로 표피의 손상이 나타났다(Figure 2). 각질형성세포의 분화 마커인 involucrin에 대한 면역조직화학염색에서는 대조군과 비교하여 변화가 없는 반면에 표피줄기세포 마커인 p63에 대한 염색에서는 대조군에 비교하여 자극제를 처리한 군에서 적게 발현되었다. 이러한 결과는 녹각교를 포함하지 않은 인공피부를 이용한 독성도 검사에서 같은 자극제로 수행되었을 때, 대조군과 비교하여 실험군의 p63의 발현 양상이 비슷한 양상을 보였던 결과[16]와 차이가 있다. 또한, sodium carbonate를 처리한 결과에서도 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 이상의 군에서 표피의 손상을 보였으며 involucrin의 발현 정도는 대조군과 차이가 없는 반면에 p63의 염색 정도가 대조군에 비해 적게 발현된 것을 관찰하였다(Figure 3).

이러한 결과로 녹각교 함유 인공피부의 표피에 영향을 주지 않는 자극 물질의 농도에서도 표피세포의 p63의 발현에 영향을 주는 것으로 추측된다. 일반적인 skin equivalent 모델의 독성도 검사에서 p63에 대한 염색이 대조군과 비교하여 차이가 없었으며 1회 도포의 자극으로 각질형성세포의 성장에는 영향을 주지 않을 것이라는 보고가 있었다[16]. 따라서 자극물질 처리 시에 p63이 감소하는 결과를 통하여 자극물질이 세포의 증식을 감소시키는 효과가 있다고 결론지을 수 있었고, 이러한 결과는 형태학적인 변화를 주로 보여주는 H&E 염색과는 달리 표피세포의 질적인 상태에 대한 정보를 제공하여 준다.

녹각교 함유 인공피부는 단층으로 배양하는 성질을 갖는 HaCaT 세포를 사용함에도 불구하고 여러 층으로 표피가 구축되었으며 기저층 또한 잘 발달된 장점을 갖는다. 피부의 물질 흡수에는 두 가지 경로가 있는데 하나는 표피의 각질층을 통하는 것이고 다른 하나는 피부의 부속물들을 통해 흡수되는 것은 잘 알려진 사실이다[17]. 표피의 각질층은 OECD의 가이드라인에 명시된 피부자극성검사의 표준화된 인공피부의 성질 중 하나이기도 하다. 녹각교 함유 인공피부는 물질의 흡수에 중요한 요인인 표피의 각질층을 구현한 모델로 자극물질의 처리에 따라 표피 세포의 p63의 발현에 영향을 끼치는 것으로도 판단된다. 이러한 각질층을 갖는 녹각교 함유 인공피부로 추가적인 연구가 수행이 된다면 동물실험을 대체하는 피부 독성도 검사에 적합한 모델이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

This study was supported by a grant (A103017) from the Korea Healthcare Technology R&D Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea.

참고 문헌

1. J. H. Draize, E. Alvarez, and M. F. Whitesell, Toxicity and primary irritation of some chemical compounds following oral administration and skin application, *Fed. Proc.*, **5**, 174 (1946).
2. C. Augustin, and O. Damour, Pharmacotoxicological

applications of an equivalent dermis: three measurements of cytotoxicity, *Cell. Biol. Toxicol.*, **11**, 167 (1995).

3. R. M. Greco, J. A. Iocono, and H. P. Ehrlich, Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix, *J. Cell. Physiol.*, **177**, 465 (1998).
4. E. Bell, B. Ivarsson, and C. Merrill, Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1274 (1979).
5. H. J. Cho, I. H. Bae, H. J. Chung, D. S. Kim, S. B. Kwon, Y. J. Cho, S. W. Youn, and K. C. Park, Effects of hair follicle dermal sheath cells in the reconstruction of skin equivalents, *J. Dermatol. Sci.*, **35**, 74 (2004).
6. C. H. Huh, S. Y. Kim, H. J. Cho, D. S. Kim, W. H. Lee, S. B. Kwon, J. I. Na, and K. C. Park, Effects of mesenchymal stem cells in the reconstruction of skin equivalents, *J. Dermatol. Sci.*, **46**, 217 (2007).
7. Y. Hijikata, T. Kano, and L. Xi, Treatment for intractable anemia with the traditional Chinese medicines Hominis Placenta and Cervi Cornus Colla (deer antler glue), *Int. J. Gen. Med.*, **2**, 83 (2009).
8. Y. E. Kim, S. K. Lee, and U. C. Yoon, Studies on the Components and biological functions of animal hard tissue. *Korean. Biochem. J.*, **6**, 13 (1973).
9. C. H. Yao, B. S. Liu, C. G. Liu, and Y. S. Chen, Osteogenic potential using a malleable, biodegradable composite added traditional Chinese medicine: *in vitro* and *in vivo* evaluations, *Am. J. Chin. Med.*, **34**, 873 (2006).
10. G. Pellegrini, E. Dellambra, O. Golisano, E. Martinelli, I. Fantozzi, S. Bondanza, D. Ponzin, F. McKeon, and M. De Luca, p63 identifies keratinocyte stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 3156 (2001).
11. A. B. Truong, M. Kretz, T. W. Ridky, R. Kimmel, and P. A. Khavari, p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes, *Genes. Dev.*, **20**, 3185 (2006).

12. R. H. Rice, and H. Green, Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions, *Cell.*, **18**, 681 (1979).
13. J. Kim, H. S. Jeong, H. Li, K. J. Baek, N. S. Kwon, H. Y. Yun, H. R. Choi, K. C. Park, and D. S. Kim, Effects of Cervi cornus Colla (deer antler glue) in the reconstruction of a skin equivalent model, *Arch. Dermatol. Res.*, **305**, 85 (2013).
14. M. A. Perkins, R. Osborne, and G. R. Johnson, Development of an *in vitro* method for skin corrosion testing, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **31**, 9 (1996).
15. R. Roguet, M. Regnier, C. Cohen, K. G. Dossou, and A. Rougier, The use of *in vitro* reconstituted human skin in dermatotoxicity testing, *Toxicol. In Vitro.*, **8**, 635 (1994).
16. S. W. Youn, H. J. Cho, I. H. Bae, and K. C. Park, Assessment of skin toxicity using living skin equivalents, *Korean. J. Dermatol.*, **41**, 308 (2003).
17. U. F. Schaefer, S. Hansen, M. Schneider, J. L. Contreras, and C.-M. Lehr, Drug Absorption Studies: In Situ, *in Vitro*, and in Silico Models, eds. C. Ehrhardt and K.-J. Kim, vol. VII, 3, Springer US press, New York (2008).