

인체 지방조직 유래 줄기 세포의
국소 주사가 광노화시킨
Albino hairless mouse의
피부 노화 개선에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의학과

이 세 빈

인체 지방조직 유래 줄기 세포의
국소 주사가 광노화시킨
Albino hairless mouse의
피부 노화 개선에 미치는 영향

지도교수 유 대 현

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의학과

이 세 빈

이세빈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 유 대 현 인

심사위원 김 현 옥 인

심사위원 이 원 재 인

연세대학교 대학원

2008년 12월

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 끊임 없는 관심과 배려, 그리고 세심한 지도를 베풀어 주신 유대현 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 논문의 작성과 심사에 많은 지도편달을 해 주신 진단검사의학과 김현옥 교수님, 성형외과 이원재 교수님께도 진심으로 감사를 드리는 바입니다.

바쁜 일정 중에도 시간을 내주어 귀중한 자료를 얻을 수 있도록 도움을 준 정지은 연구원에게 고마운 마음을 전합니다.

사랑과 관심을 가지고 지켜봐 주시며 묵묵히 힘이 되어 준 부모님께 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 변함 없이 곁에서 지켜주고 힘이 되어 준 아내와 기쁨을 나누고 싶습니다.

2008년 12월

저자 씀

차례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 실험 동물 및 UVB 조사 스케줄	7
2. 피부 주름 획득 및 평가	9
3. hADSC 투여	9
4. 조직학적 변화 관찰	10
5. 통계학적 결과 분석	10
III. 결과	11
1. 피부 표면의 육안적 변화	11
2. 피부 주름의 평가	13
3. 표피와 진피 두께의 조직학적 변화	16
4. 콜라젠과 탄력소의 변화	21
IV. 고찰	24
V. 결론	28
참고문헌	29
영문요약	34

그림 차례

그림.1. hADSC 투여 5주 후 Albino hairless mouse 피부의 육안적 변화.	12
그림.2. Replica를 통해 얻어진 Albino hairless mouse의 피부.	14
그림. 3. Replica를 이용해 얻은 영상의 조면 지표 분석.	15
그림. 4. Replica의 전체 주름의 면적 비율과 수 분석.	15
그림. 5. hADSC 투여 후 표피의 조직학적 변화.	17
그림. 6. hADSC 투여 후 표피 두께 변화.	18
그림. 7. hADSC 투여 후 진피의 조직학적 변화.	19
그림. 8. hADSC 투여 후 진피 두께 변화.	20
그림. 9. hADSC 투여 후 콜라젠 변화.	22
그림. 10. hADSC 투여 후 탄력소의 변화.	23

표 차례

표 1. Albino hairless mouse UVB 조사 스케줄	8
--	---

국문요약

인체 지방조직 유래 줄기 세포의 국소 주사가 광노화시킨 Albino hairless mouse의 피부 노화 개선에 미치는 영향

피부 노화는 자연 노화 과정인 내인성 노화와 환경적 요소들에 의해 발생하는 외인성 노화의 두 가지 과정에 의해서 일어난다. 이중 외인성 노화는 자외선 B (Ultraviolet B, 이하 UVB로 표기함)가 주원인으로 작용하며 흔히 광노화라고 한다

광노화된 피부는 자연 노화와는 달리 육안적으로는 깊은 주름, 피부이완, 피질양상, 모세혈관확장 등의 특징을 나타내며 조직학적으로는 표피, 진피의 두께가 증가하고 정상적인 콜라겐 구조가 파괴되고 콜라겐 섬유의 무질서한 배열이 나타나며 파괴된 자리는 글라이코스아미노글라이칸, 프로테오글라이칸 등으로 대체되고 비정상적인 탄력섬유 덩어리들이 증가하는 탄력섬유증 등을 특징적 양상으로 나타낸다.

인체 지방조직 유래 줄기 세포 (Human adipose tissue derived stem cell, 이하 hADSC로 표기함)는 골수 유래 줄기 세포, 제대혈 유래 줄기 세포와 유사한 성질을 보이면서도 조직을 얻기가 쉽고 신체에 풍부하게 존재하며 분리 과정이 간단하다는 장점이 있어 최근 많이 연구되고 있다. hADSC의 역할은 세포간 직접 접촉에 의해서 또는 분비인자를 분비하여 측분비 효과를 통하여 섬유모세포의 증식을 촉진 시킨다고

알려져 있으며 이는 광노화에 의해 발생한 세포 활성화도 변화로 인한 일련의 구조적, 기능적 소실에 hADSC가 보상적인 역할을 할 수 있을 것이라는 가능성을 보여 준다.

따라서 UVB를 조사하여 광노화를 유발시킨 Albino hairless mouse의 피부에서 실험군은 hADSC를 Dulbecco's phosphate buffered saline(이하 DPBS로 표기함)과 함께, 대조군은 DPBS만을 각각 피내 주사하여 피부 광노화시 이의 개선 효과를 평가하고자 하였다. 일정 부위에 hADSC 주사 전과 5주 후 각각 Replica를 이용하여 얻은 주름 영상을 분석하고 피부 조직을 채취하여 피부의 변화를 살펴 본 결과 조면지표인 Rz는 hADSC 군에서 55.07 감소, 대조군에서 4.19 감소하였고, Ra는 hADSC 군에서 12.23 감소, 대조군에서 1.28 감소하여 hADSC 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. 전체 주름의 면적 비율을 나타내는 Shadows 통계적으로 유의하지는 않지만 hADSC 투여군에서 4.36 감소, 대조군에 1.20 증가하였다. 주름의 수를 나타내는 Num Wrinkles은 hADSC 투여군에서 50.40 감소, 대조군에서 1.00 증가하여 통계적으로 유의하게 hADSC 투여군에서 감소하였다. 표피의 두께는 hADSC 투여군 29.6 μm , 대조군에서 55.52 μm 로 hADSC 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소했고, 진피의 두께도 hADSC 투여군 415.88 μm , 대조군 605.00 μm 로 hADSC 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소했다. 콜라젠과 탄력소의 비정상적인 변화도 조직학적으로 회복된 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 hADSC가 Albino hairless mouse에서 광노화에 의하여 손상된 피부를 개선시키고 이로 인하여 발생한 주름을 감소 시킬 수 있음을 제시한다

핵심되는 말 : UVB, Albino hairless mouse, 광노화, hADSC

인체 지방조직 유래 줄기 세포의 국소 주사가 광노화시킨
Albino hairless mouse의 피부 노화 개선에 미치는 영향

<지도교수 유 대 현>

연세대학교 대학원 의학과

이 세 빈

I. 서론

오늘날 노령층에 대한 인식은 사회에 대한 기여 없이 전문 간호를 받으며 생의 후반부를 보내는 과거의 것에서부터 고령까지 육체적, 정신적으로 건강함을 유지하면서 사회의 구성원으로 기여를 하며 지내는 것으로 변화 되고 있다.¹ 더불어 젊음에 대한 인간의 욕구는 과거부터 끊임 없이 추구 되어 왔고 이로 인해 회춘에 대한 요구가 증대되었으며 육안적으로 가장 대표적인 회춘은 젊은 피부 상태로 성형외과적 영역에서는 피부 노화에 대한 수술적 치료의 수요가 증가하고 충전제 등의 다양한 비침습적인 치료 방법들이 개발되고 있다.

피부의 경우 노화가 진행된다면 점진적으로 정상적인 구조와 기능적인 특징이 소실되는데 이는 생물학적으로 뚜렷이 구별되는 내인성 노화 및 외인성 노화 이 두 가지 과정에 의한다. 내인성 노화는 나이가 들어감에 따라 발생하는 노화로 이는 자연노화

과정에 의해 일어나며 다른 장기의 노화와 유사한 방식으로 피부에 영향을 준다. 외인성 노화는 환경적인 요소들, 특히 UVB가 주원인으로 작용하는 광노화의 과정으로써 외부적인 요소에 의한 것이라 해서 외인성 노화라고 한다.²

UVA와 UVB는 일시적 혹은 영구적인 유전자 손상과 성장, 분화, 노화, 결체조직 퇴행과 관계된 세포질내 신호 전달 경로를 활성화시킨다.³

이러한 내인성 노화와 외인성 노화는 임상적으로도 많은 차이를 보인다. 내인성 노화인 경우 피부는 미세한 주름이 늘어나며 부드러운 감촉을 보인다. 이에 반해 외인성 노화는 피부에 깊은 주름, 피부이완, 피질양상, 모세혈관확장 등을 유발시킨다.

자외선으로부터 보호 받은 피부는 자연적 노화에 따라 조직학적 표피가 10-50% 정도 얇아지고 기저세포층의 유사분열이 감소하며 진피-표피 경계부가 편평해지고 멜라닌 세포와 랑게르한스 세포의 수가 감소한다. 또한 진피에서는 점진적인 두께의 감소가 보이고 섬유모세포의 감소와 함께 세포외바탕질 위축이 나타나며 콜라젠과 탄력소의 감소를 보인다.⁴ 이에 반해 자외선에 의해 손상 받은 피부는 표피층의 극성이 소실되고 두꺼워지며 섬유 모세포와 염증 세포들의 침윤으로 진피층에 세포수가 증가한다. 정상적인 콜라젠 구조가 파괴되고 콜라젠 섬유의 무질서한 배열이 나타나며 파괴된 자리는 글라이코스아미노글라이칸, 프로테오글라이칸 등으로 대체되고 비정상적인 탄력섬유 덩어리들이 증가하는 탄력섬유증이 나타나 전반적으로 진피가 두꺼워진다.^{5,6}

최근 들어 성체 줄기 세포 특히 hADSC에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. hADSC는 형태, 면역 표현형, 중간엽 세포 분리

성공률, 집락 빈도, 분화능에 있어 골수 유래 줄기 세포, 제대혈 유래 줄기 세포와 차이가 없으면서도 쉽게 접근할 수 있고 수술적으로 다량의 조직을 얻기가 간단하고 신체에 풍부하게 존재하며 분리 과정이 복잡하지 않아 성체 줄기 세포의 공급처로 많이 연구되고 있다.⁷

hADSC가 표피세포 및 진피 섬유모세포에 미치는 영향에 대한 많은 연구들이 보고 된 바 있는데 Martin 등은 알-trans 레틴산과 같이 배양한 hADSC가 표피세포로 분화되었다고 보고하였으며⁸, 김 등은 hADSC와 진피 섬유 모세포와 같이 배양할 때 진피 섬유모세포의 증식을 촉진 시켰다고 하였다. 즉 hADSC를 배양 했던 배지가 진피 섬유 모세포의 증식을 촉진 시키고 hADSC가 세포간 직접 접촉에 의해서 또는 분비인자를 분비하여 측분비로 섬유모세포의 증식을 촉진시킨다고 보고했다.^{9, 10} Gino 등은 방사선 치료로 손상 받은 창상에 hADSC를 주입했을 때 신생혈관 생성과 창상의 호전을 보고하였다.^{11, 12, 13, 14, 15}

이러한 hADSC의 표피세포 및 진피 섬유모세포에 대한 긍정적인 치유 효과는 광노화에 따른 세포의 활성화 변화로 인한 일련의 구조적, 기능적 소실에도 보상적인 역할을 하여 변형된 피부 구조물을 복구하고 이로 인하여 이차적으로 주름이 개선될 것이라는 가설을 세울 수 있다.

따라서 hADSC가 광노화된 피부를 재생하여 피부 주름을 감소시킬 것이라는 가설하에 본 연구는 UVB를 조사하여 광노화를 유발시킨 Albino hairless mouse의 피부조직에 hADSC 이식 후 피부 광노화에 대한 개선 효과를 알아 보고자 하였다.^{16, 17, 18}

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물 및 UVB 조사 스케줄

8 주령의 암컷 Albino hairless mouse : HR-1 10 마리를 이용하였고 모든 동물 실험은 Guide for the care and use of laboratory animals 에 따라 진행하였으며, 연세대학교의 실험동물위원회의 승인을 받았다. 1 주간의 순응 과정을 거쳐 UVB 조사를 시행했다. UVB 광원으로 312nm 파장대의 UV Lamp (Vilver Lourmat Co, Cedex, France)를 사용하였다. 15 x 5 x 15 cm³ stainless steel chamber 안에 Albino hairless mouse 를 넣고 12.7cm (5inch) 높이에서 UVB 를 조사했다. 본실험전 논문고찰과 반복적인 전실험을 통하여 화상이나 조직 괴사를 일으키지 않으면서 가장 주름을 많이 형성할 수 있는 조사 강도 및 조사량, 일정을 확정하였다. 조사 강도는 UVB meter (National Biological Co, Twinsburg, OH, USA)를 사용하여 측정하였다. UVB 의 조사량은 25mJ 에서부터 100mJ 까지 시간을 점점 늘리는 방식을 택하였다. 첫 주에는 하루에 한 번 1.8 분씩, 이후에는 하루에 두 번씩 조사하여 두 번째 주에는 1.8 분, 세 번째 주에는 2.7 분 네 번째 주부터 여섯 번째 주까지 3.6 분씩 UVB 를 조사하였다. UVB 용량은 1.8 분간 25mJ/cm² 가 조사되어 6 주 스케줄 후에는 총 2700mJ/cm² 이 조사되었다. (표 1.)

표 1. Albino hairless mouse UVB 조사 스케줄

Peoriod	Exposure duration ¹						Dosage/week ²
	Mon	Tue	Wed	thu	Fri	Sat	
1st week	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	150
2nd week	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	300
	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	
3rd week	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	450
	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	
4th week	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	600
	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	
5th week	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	600
	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	
6th week	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	600
	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	

¹ 단위는 분으로 첫 주에만 하루에 한 번 이후에는 하루에 두 번 조사함.

² 단위는 mJ/cm² 으로 1.8 분간 25 mJ/cm² 가 조사되어 6 주 후 총 2700 mJ/cm²이 조사 됨.

2. 피부 주름 획득 및 평가

6 주간의 UVB 조사가 끝난 후 hADSC 투여 그리고 투여 후 5 주에 투여 부위의 주름 Replica 를 획득하였다. Replica locator ring 과 Silicon 으로 구성된 Replica - Repliflo Cartridge Kit (CuDerm Co, Dallas, TX, USA)을 사용하였으며 피부에 부착할 수 있는 Replica locator ring 을 Albino hairless mouse 의 정해진 부위, 일정한 방향에 부착하고 Silicon 을 주입한 후 떼어 내어 피부 Replica 를 얻었다. 획득한 Replica 에 25 도 각도에서 빛을 쬐어 그림자를 만들어 얻어낸 영상을 Optical profilometry (BioNET Inc, Southbridge, MA, USA)를 이용하여 분석하였다.

즉 Replica 에서 일정한 길이의 10 개 선을 따라 명암도를 측정하여 각 선의 최대 주름의 평균값 (Rz), 각 선의 모든 주름의 평균값 (Ra)을 얻었으며 Replica 를 일정한 너비의 절편으로 나누어 각각의 절편에 대해 일정한 역치 이하의 명암도를 가진 주름만을 분석하여 검출역치 이하의 휘도값을 갖는 면적의 비율 (Shadow)과 검출 된 주름의 총 개수 (Num Wrinkles)를 얻어 이들 네 가지 값을 조면 지표로 이용하였다.

3. hADSC 투여

hADSC 은 5 번째 계대 배양한 세포를 사용하였다. 6 주간의 UVB 조사가 끝난 다음 날 10 마리의 Albino hairless mouse 를 5 마리씩 실험군과 대조군으로 나누었다. 복강내 마취 (Ketamine : 44mg/kg, xylazine 13mg/kg)하에서 Albino hairless mouse 의 등에 2 X 2 cm 크기의 주사 부위를 Gentian violet 용액으로 표시한 후 인슐린 주사기를 이용하여 실험군은 DPBS 와 hADSC(5

$\times 10^6$ cells)를 함께, 대조군은 DPBS 만 0.5ml 씩 피내 주사하였다. hADSC 를 주입할 부위는 주름이 가장 잘 형성 되어 있는 후경부를 선택하였고 표시된 부위에 균일하게 분포 되도록 주사하였다.

4. 조직학적 변화 관찰

hADSC 투여 5 주 후 원위부위부터 피부를 박리하여 주사한 부위를 최대한 보존하여 조직을 얻었다. 얻어진 조직은 10% 포르말린 완충 용액에서 고정한 후 파라핀 블록을 만든 후 절편을 얻어 표본을 제작하였다. 또한 UVB 의 영향을 받지 않은 정상 피부와 비교하기 위해 age-match 된 UVB 를 조사하지 않은 Albino hairless mouse 5 마리에서도 조직을 얻었다. Hematoxylin & eosin stain 을 하고 각질층의 외부 경계부터 진피표피 경계부의 기저막까지의 직선 거리를 재어 표피의 두께를 측정하였다. Masson's trichrome stain 을 하고 진피표피 경계부의 기저막부터 피하조직의 일부인 육상층 사이의 거리를 재어 진피의 두께를 재고 콜라겐의 변화를 살펴보았다. 진피내의 탄력소의 변화 평가를 위해 Verhoeff van Gieson stain 을 하였다.

5. 통계학적 결과 분석

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준 편차로 표시하였으며, 각 군간의 비교는 student's T - test 를 통하여 유효성 여부를 검정하였다. p 값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 평가 하였다.

III. 결과

1. 피부 표면의 육안적 변화

실험군과 대조군 모두 UVB 조사 후 Albino hairless mouse 후경부에 주름의 수가 늘고 깊어지며 피부 감촉이 거칠어 지는 등 광노화에 합당한 소견을 보였다. 주름은 복배 방향으로 평행하게 주행하고 UVB 조사 부위 전체에 깊은 구와 넓은 능이 형성되는 양상을 보였다. hADSC를 투여한 5주 후에는 hADSC 투여군에서 주름이 눈에 띄게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. (그림. 1.)

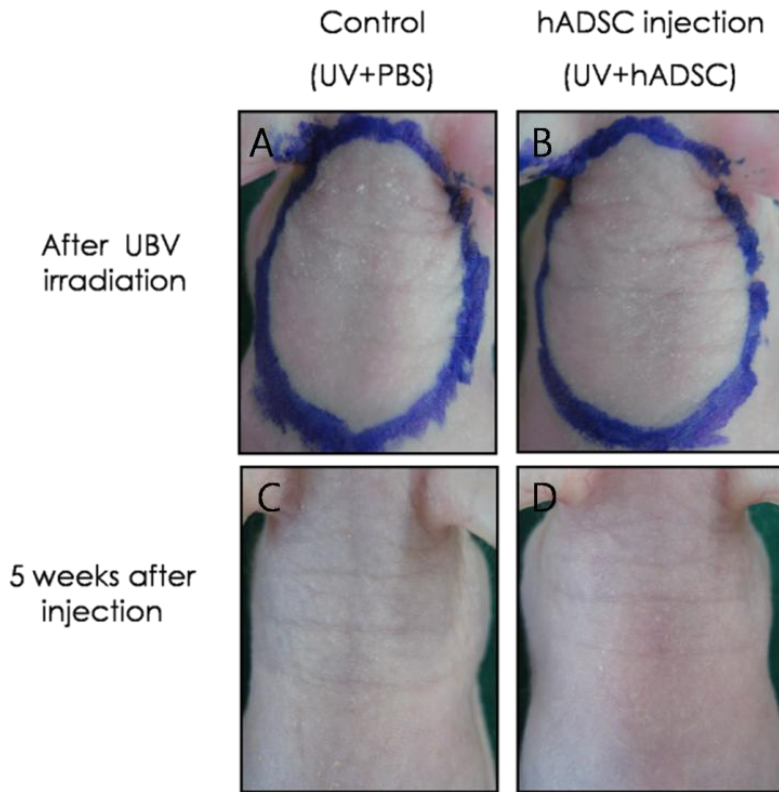


그림. 1. hADSC 투여 5 주 후 Albino hairless mouse 피부의 육안적 변화. A, B. UVB 조사 후의 Albino hairless mouse의 피부에는 광노화에 합당한 변화가 일어나 깊고 많은 주름이 형성된 것을 볼 수 있었다. C. DPBS 투여 5주 후 대조군에서는 투여전과 비교하여 주름의 변화가 뚜렷하지 않았다. D. hADSC 투여 5주 후 투여 전과 비교하여 주름이 눈에 띄게 감소하였다.

2. 피부 주름의 평가

Replica로부터 얻어낸 영상에서 hADSC 투여군에서 대조군에서 보다 주름이 개선된 것을 볼 수 있었다. UVB를 조사하지 않은 정상의 피부와 비교해 보면 hADSC를 투여한 군은 정상의 피부 표면에 가깝게 노화가 개선되는 것을 관찰할 수 있었다. (그림. 2.)

조면지표인 Rz와 Ra은 주름이 감소할수록 두 값 모두 감소하게 된다. Rz는 hADSC 군에서 55.07, 대조군에서 4.19 감소하였고, Ra는 hADSC 군에서 12.23, 대조군에서 1.28 감소하여 hADSC 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. (그림.3.)

전체 주름의 면적 비율을 나타내는 Shadows와 주름의 수를 나타내는 Num Wrinkles 역시 주름이 회복 될수록 감소하게 되는데 Num wrinkle의 경우 hADSC 투여군에서 50.40 감소, 대조군에서 1.00 증가하여 통계적으로 유의하게 hADSC 투여군에서 감소하였다. Shadows의 경우 통계적으로 유의하지는 않지만 hADSC 투여군에서 4.36 감소, 대조군에 1.20 증가하여 hADSC투여군에서 감소한 양상을 보였다. (그림. 4.)

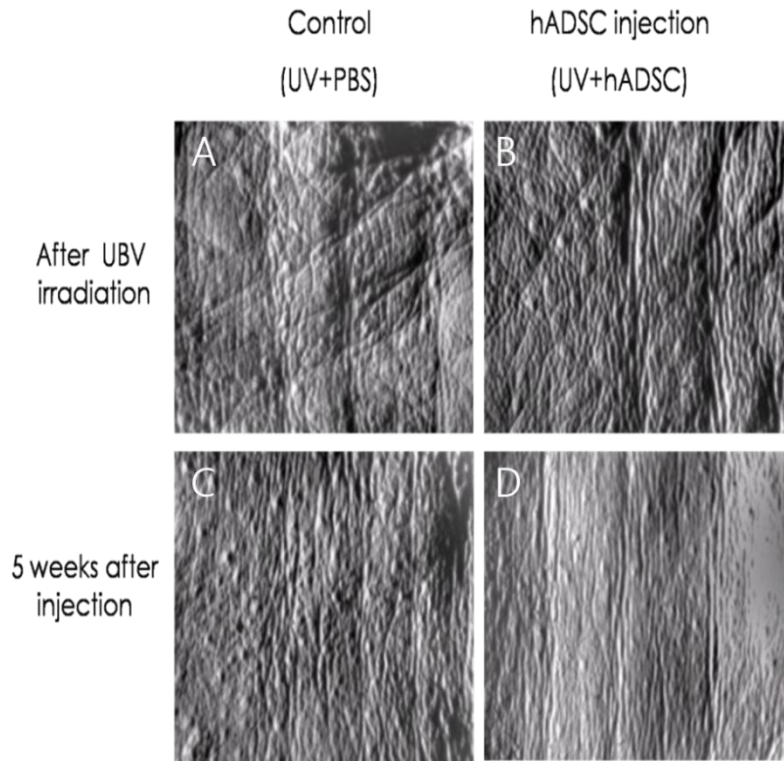


그림. 2. Replica를 통해 얻어진 Albino hairless mouse의 피부. A, B. UVB 조사 후 주름이 증가하였다. C. DPBS 투여 5주 후 대조군에서는 투여전과 비교하여 주름의 변화가 뚜렷하지 않았다. D. hADSC를 투여 5 주 후 대조군에 비해 주름이 개선된 것을 볼 수 있었다.

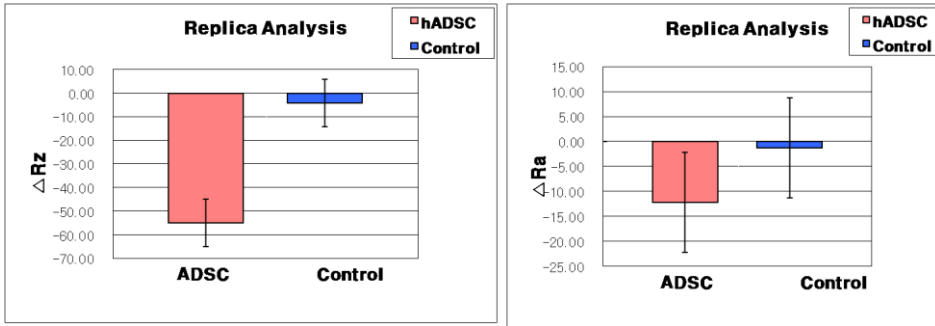


그림. 3. Replica를 이용해 얻은 영상의 조면지표. hADSC 투여 후 Rz는 hADSC 군에서 55.07 감소, 대조군에서 4.19 감소하였고, Ra는 hADSC 군에서 12.23 감소, 대조군에서 1.28 감소하여 hADSC 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. ($P < 0.05$)

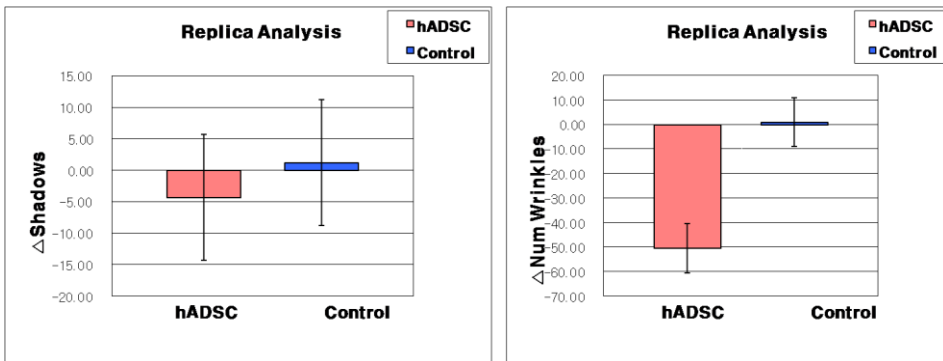
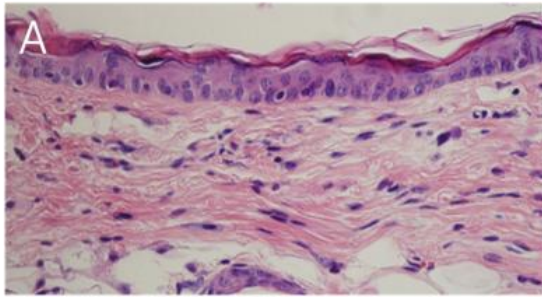


그림. 4. Replica의 전체 주름의 면적 비율과 수 분석. Shadows의 경우 통계적으로 유의하지는 않지만 hADSC 투여군에서 4.36 감소, 대조군에 1.20 증가하였다. Num wrinkle의 경우 hADSC 투여군에서 50.40 감소, 대조군에서 1.00 증가하여 통계적으로 유의하게 hADSC 투여군에서 감소하였다. ($P < 0.05$)

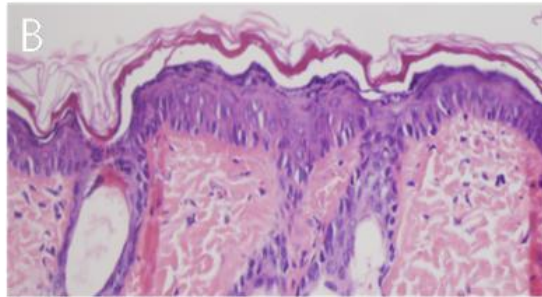
3. 표피와 진피 두께의 조직학적 변화

대조군은 과각화증과 표피증식증을 보였으나 실험군은 표피의 두께가 대조군에 비해 감소되어 UVB를 조사하지 않은 정상 피부의 표피 두께 19.67 μm 에 가까워졌음을 볼 수 있었다. (그림. 5.) 각질층의 외부 경계부터 진피표피 경계부의 기저막까지의 직선 거리를 측정해서 얻은 표피의 두께는 hADSC 투여군 29.6 μm , 대조군에서 55.52 μm 로 통계적으로 유의하게 hADSC 투여군에서 감소했다. (그림. 6.)

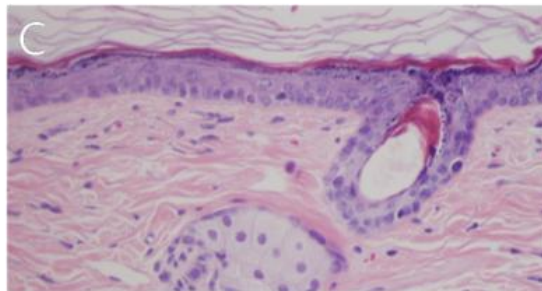
Masson's trichrome stain 상 hADSC 투여 후에 진피의 두께가 대조군에 비해 감소하였다. (그림. 7.) 표피와 진피의 경계에서부터 육상층 사이의 거리를 재어 측정한 진피의 두께는 hADSC 투여군 415.88 μm , 대조군 605.00 μm 로 통계학적으로 유의하게 hADSC 투여군에서 감소하였다. (그림. 8.)



Normal group
(Non - irradiated)



Control group
(UV + PBS)



hADSC group
(UV + hADSC)

그림. 5. hADSC 투여 후 표피의 조직학적 변화. A. UVB를 조사하지 않은 Albino hairless mouse의 정상 표피 B. 대조군에서는 정상 피부에 비해 표피의 두께가 증가 되었다. C. hADSC 투여 후 표피의 두께가 대조군에 비해 감소하여 정상 피부의 표피 두께에 가까워졌다. (Hematoxylin & eosin stain, X 400)

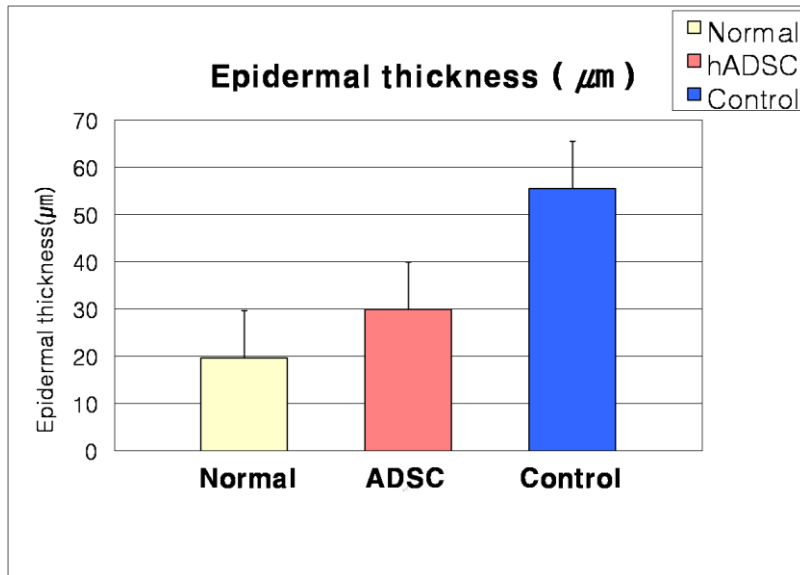
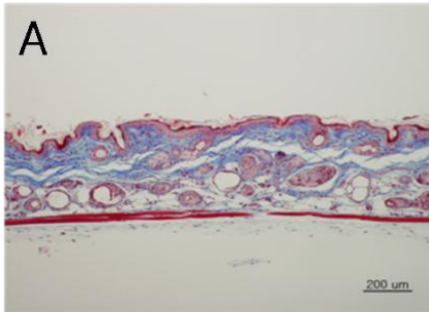
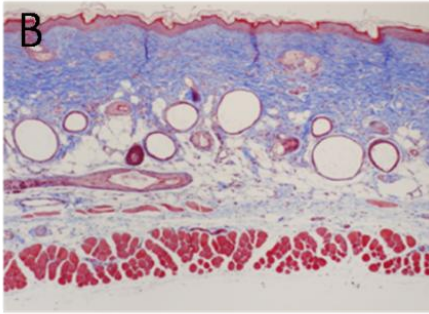


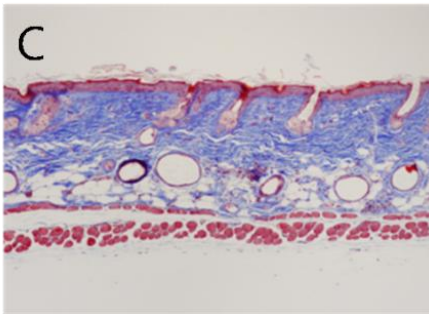
그림. 6. hADSC 투여 후 표피 두께 변화. 표피 두께는 hADSC 투여군 29.6 μm , 대조군에서 55.52 μm 로 통계적으로 유의하게 hADSC 투여군에서 감소했다. ($P < 0.05$)



**Normal group
(Non – irradiated)**



**Control group
(UV + PBS)**



**hADSC group
(UV + hADSC)**

그림. 7. hADSC 투여 후 진피의 조직학적 변화. A. UVB를 조사하지 않은 Albino hairless mouse의 정상 진피 B. 대조군에서는 정상 피부에 비해 진피의 두께가 증가 되었다. C. hADSC 투여 후 진피의 두께가 대조군에 비해 감소하여 정상 피부의 진피 두께에 가까워졌다. (Masson's trichrome stain, X100)

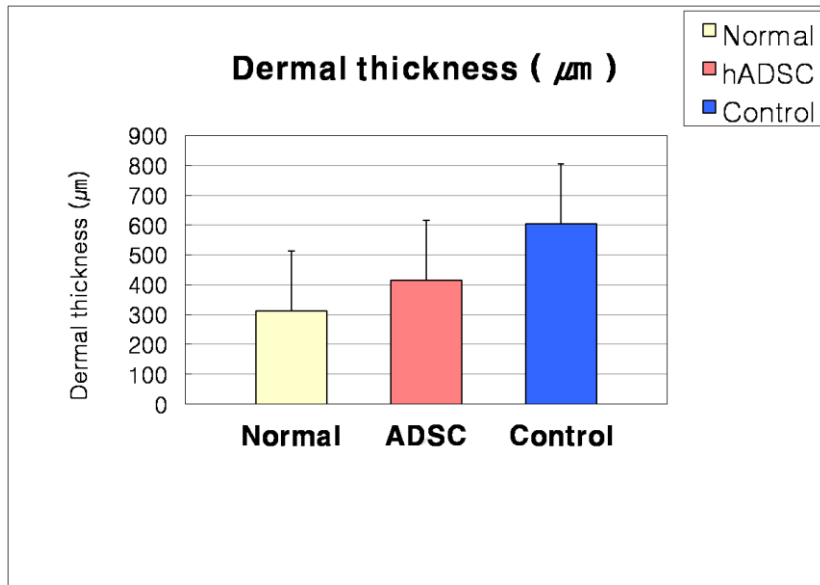
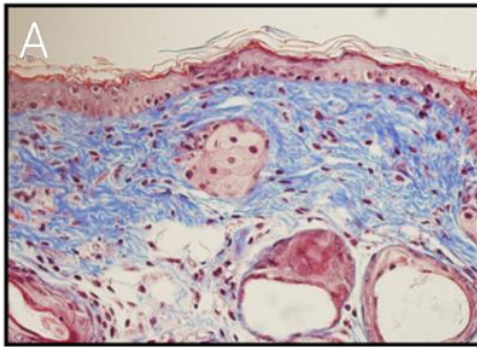


그림. 8. hADSC 투여 후 진피 두께 변화. 진피의 두께는 hADSC 투여군 415.88 μm, 대조군 605.00 μm로 통계학적으로 유의하게 hADSC 투여군에서 감소하였다. (P<0.05)

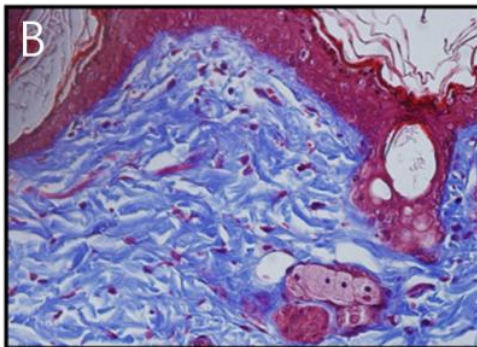
4. 콜라젠과 탄력소의 변화

UVB를 조사하지 않은 정상 피부에서는 규칙적으로 배열된 콜라젠 구조가 보였다. 이에 반해 대조군에서는 콜라젠 다발의 미세한 구조가 소실되고 콜라젠의 파괴와 무질서한 배열을 보였다. hADSC 투여군이 대조군에 비해 보다 규칙적인 구조를 갖는 콜라젠을 보이는 것을 확인할 수 있었다. (그림. 9.)

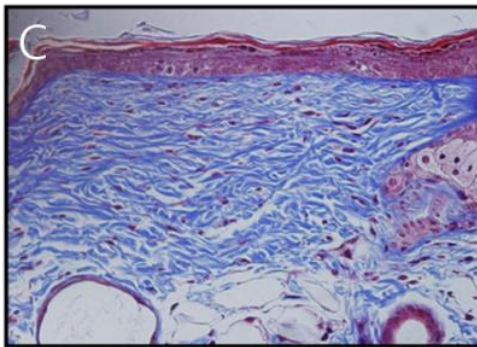
UVB가 조사된 대조군에서 엉키고 두꺼워진 탄력 섬유가 축적되어 국한적인 덩어리를 이루는 탄력섬유증을 볼 수 있었다. hADSC 투여군에서는 UVB를 조사하지 않은 피부의 탄력소망을 회복하지는 못하였지만 대조군에 비해 정상에 가까워진 모습을 볼 수 있었다. (그림. 10)



Normal group
(Non – irradiated)

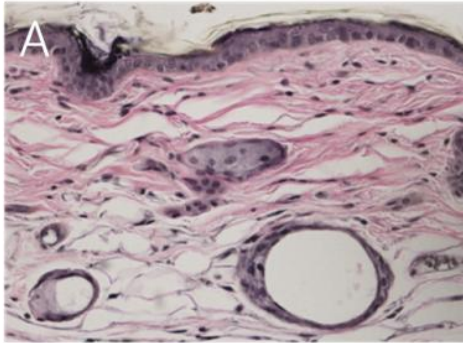


Control group
(UV + PBS)

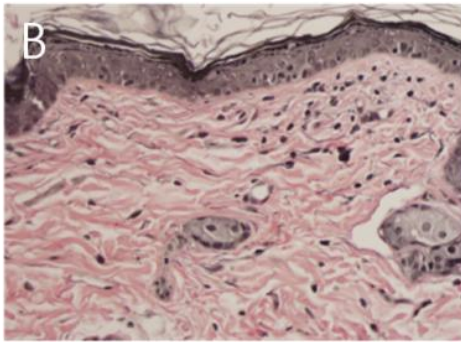


hADSC group
(UV + hADSC)

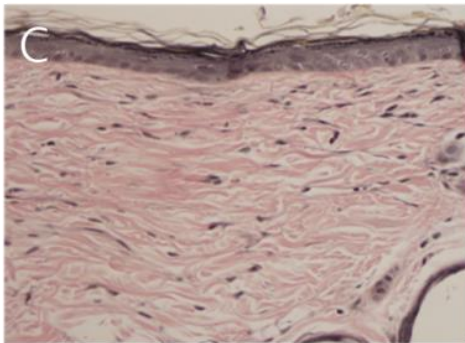
그림. 9. hADSC 투여 후 콜라겐의 변화. A. UVB를 조사하지 않은 Albino hairless mouse의 정상 콜라겐 B. 대조군에서는 다발의 미세한 구조가 소실되고 콜라겐의 파괴와 무질서한 배열을 보였다. C. hADSC 투여 후 대조군에 비해 보다 규칙적인 구조를 갖는 콜라겐을 보였다. (Masson's trichrome stain, X100)



**Normal group
(Non - irradiated)**



**Control group
(UV + PBS)**



**hADSC group
(UV + hADSC)**

그림. 10. hADSC 투여 후 탄력소의 변화. A. UVB를 조사하지 않은 Albino hairless mouse의 정상 탄력소 B. 대조군에서는 탄력섬유증을 보였다. C. hADSC 투여 후 대조군에 비해 정상에 가까워진 탄력소망을 보였다. (Verhoeff van Gieson stain, X400)

IV. 고찰

Kligman 등에 의해 노화된 피부에 대한 실험 모델이 처음 소개된 이래 hairless mouse를 광노화 연구의 가장 적합한 동물 모델로 사용해 왔다¹⁹. Hairless mouse의 피부에 UVB가 조사되면 표피가 과형성되고 정상적인 콜라겐의 구조가 파괴되면서 콜라겐의 무질서한 배열이 나타나고 탄력섬유증이 발생하며 글라이코사미노글라이칸이 증가하게 된다. 진피낭의 증식을 제외하고는 자외선에 손상 받은 인간의 피부와 거의 유사한 피부 변화를 보이므로 본 실험에서도 이 동물 모델을 선택하였다.

Donald 등은 자외선에 의해 일어나는 피부 노화의 실험 모델의 유용한 지표로 간단하고 비침습적인 육안적 피부 변화와 변화된 피부 표면의 물리적 측정을 제시하였다.²⁰ 그 밖의 여러 연구에서 광노화 예방을 위한 치료제의 효과를 측정하는 지표로 표피 두께와 진피 두께 변화의 정량적 측정, 진피층의 콜라겐, 탄력소 변화 등이 사용되었다.^{21,22,23} 이와 같은 지표들은 Albino hairless mouse를 이용한 광노화 모델에서 hADSC의 노화 개선의 영향을 알아 보는 데에도 유용하게 사용될 수 있다.

광노화 피부는 임상적으로 깊은 주름, 피부이완, 피질양상, 모세혈관확장 등을 보인다. 본 실험에서 Replica로 얻은 주름 영상을 비교 분석한 조면지표와 주름의 수는 통계학적으로 유의하게 감소하였으며 통계적으로 유의하지는 않았지만 주름의 면적 비율도 감소하였다. 이는 UVB 조사 Albino hairless mouse 피부 표면의 육안적 변화와 일치하는 결과로 hADSC의 투여가 임상적으로 광노화 피부를 개선시켰음을 정량적으로 보여 주는 결과라 할 수 있다.

hADSC는 기질혈관분획이라 불리는 지방흡인물 내의 비지방세포 아군집으로 분화능이 확인된 성체 줄기 세포이다. hADSC는 골수 유래 줄기 세포, 제대혈 유래 줄기 세포와 유사한 표면 항원과 분화능을 보이는데 다른 줄기 세포에 비해 조직을 얻기에 용이하고 분리 과정이 간단하다는 장점이 있어 많이 연구되고 있다

조직학적으로 hADSC 투여군에서 과각화증에 의해 증가된 표피의 두께와 콜라겐의 무질서한 배열, 글라이코스아미노글라이칸의 증가, 탄력섬유증 등에 의해 증가된 진피의 두께가 감소 되었다. 또한 콜라겐 파괴 및 무질서한 배열의 회복 및 무정형의 탄력섬유성 물질의 축적에 의해 발생하는 탄력섬유증의 완화 소견을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 정확한 기전은 불분명하지만 투여된 hADSC가 UVB에 의해 손상되었던 진피내 결합조직의 구성성분들이 회복되는데 기여하고 있음을 보여준다.

Oba 등은 UVB를 조사한 Hairless mouse에서 조사 기간별로 주름과 진피내의 콜라겐 변성 정도의 상관성을 비교해서 주름의 형성과 진피내 결합조직의 3차원적인 구조가 피부의 물리적 변화, 즉 주름의 형성을 야기한다고 보고했다.²⁴ 이번 연구에서도 UVB 조사 후와 hADSC 투여 5주 후의 피부 표면의 임상 양상과 조직학적인 콜라겐 변성과의 상관성이 높아 진피 콜라겐의 3차원적 구조 변화가 주름을 발생 시킨다는 Oba의 가설에 부합하였다.

자외선 조사로 발생한 활성산소종은 피부의 광노화와 관련이 있다. 탄력소의 축적과 콜라겐의 분해는 광노화 피부의 특징이며 이 과정에서일중항산화, 과산화물, 과산화수소 등이 자외선에 의한 피부 손상에 관여한다고 알려져 있다.^{25,26} 활성산소종은 콜라겐을 직접 분해하거나 기질금속단백분해효소 억제물질을 불활성화 시키며

금속단백분해효소(이하 MMP로 표기함)를 합성하여 콜라겐을 분해한다. 결합조직을 분해시키는 세린 같은 다양한 MMP가 생체내 및 생체의 실험에서 UVA와 UVB 조사에 의해 선량의존적으로 유도되는 것이 확인 되었다. MMP-1은 제 1형 콜라겐을 MMP-2는 제 4형 콜라겐, 제 7형 콜라겐을 포함해서 기저막의 구성물과 탄력소를, MMP-3는 제 4형 콜라겐, 프로테오글라이칸, 피아브로넥틴, 라미닌을 분해한다.^{27,28,29} 또한 탄력소 전구물질 mRNA를 증가시켜 엉키고 두꺼워진 비정상적인 탄력소를 축적해 탄력섬유증을 일으킨다.

30

hADSC는 혈관내피세포성장인자, 간세포성장인자, 섬유모세포성장인자 같은 사이토카인을 분비한다. 사이토카인의 생산과 분비는 hADSC의 주요 기능으로 분비된 사이토카인은 다양한 약리작용을 보인다. hADSC가 사이토카인을 통하여 측분비 효과를 나타내는 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 산화성 손상으로부터 섬유모세포를 보호하는 항산화효과를 나타낸다는 연구 결과들이 있다.^{31,32}

hADSC를 투여 받은 Albino hairless mouse에서 활성산소종나 활성산소종을 분해하는 효소들을 정량적으로 분석하여 투여된 hADSC가 생체 내에서 항산화 효과를 나타내는지 확인해 본다면 hADSC의 광노화 개선에서 콜라겐과 탄력소의 회복에 대한 기전을 밝히는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다

각질형성세포를 UVB에 노출시키면 인터루킨 (이하 IL로 표기함)-1, IL-6, IL-8, IL-10 & 종양괴사인자- α 같은 전염증기 사이토카인을 분비한다. 특히 IL-1은 다면발현성 전염증기 사이토카인으로써 다른 사이토카인 (IL-6, IL-8, 종양괴사인자- α)과 성장인자, 단백분해효소,

염증 매개체를 유도하여 세포 성장과 분화, 조직 치유, 면역반응 조절에 중요한 역할을 한다. 염증반응은 염증 부위에 활성산소종을 생성해 조직을 손상 시킬 수 있다.²² 따라서 추후 연구에서 hADSC의 항염증 효과에 대한 분석을 시행하면 활성산소종에 의한 조직 손상을 통한 광노화에서 hADSC의 광노화 개선 기전을 이해하는데 도움이 될 것이다.

이번 연구는 생체내에서 투여된 hADSC가 UVB 조사에 의한 광노화 개선에 효과가 있음을 실험적으로 정량적인 결과를 얻어 입증했다는데 의미가 있다. 하지만 임상적으로 hADSC가 피부노화 개선 치료로 사용되려면 광노화 개선 기전이나 생체내 안전성 및 용량, 투여방법 등에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다. 이러한 과제들이 해결된다면 자가 hADSC를 이용한 피부 노화 치료법을 임상 적용할 수 있을 것이다.

V. 결론

UVB를 조사하여 광노화를 유발시킨 Albino hairless mouse의 피부에 hADSC를 피내 주사를 통하여 투여한 결과 광노화에 의해 생긴 피부 주름의 깊이, 개수, 범위 등의 임상적 증상을 통계학적으로 유의미한 차이로 호전시켰으며 광노화에 의해 야기된 표피 및 진피 두께의 증가 등 조직학적 변화를 감소시켰으며 콜라겐 변성, 탄력섬유증 등의 손상을 정상적인 구조로 회복시켰다. 따라서 hADSC의 국소투여는 피부 노화를 수복할 수 있는 항노화 기능을 매우 강력하게 유도한다고 판단된다 .

참고문헌

1. Colorado. Latest advance in antiaging medicine. Keio J Med 54:85-94,2005
2. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging : comparative histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of skin. Exp Dermatol 11:398-405,2002
3. Wlaschek M, Tancheva-poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wof Z, et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. J Photochem Photobiol 63:41-51,2001
4. Evgenia M, Christos CZ. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. Dermatol 214:352-60,2007
5. Wlaschek M, Tancheva-poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wof Z, et al. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. Clin Dermatol 26:592-9,2001
6. Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, Godeau G. Elastin change during chronological and photo-ageing : the important role of lysozyme. Eu J Acad Dermatol Venereol 20:980-7,2006
7. Andreas S, Christa B. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. Stem Cell 25:818-27,2007
8. Martin B, Helmut G, Stefan G, Patrick B. Epithelial differentiation

- of human adipose tissue-derived adult stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 220:142-50,2005
9. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 48:15-24,2007
 10. Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, Akino K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol* 153:29-36,2005
 11. Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Benati D, Krampera M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cell. *Plast Reconstr Surg* 119:1409-22,2007
 12. Timothy AM, Min Z, Marc HH. Adipose-derived stem cell and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 118:121-8,2006
 13. El-ghabzouri A, Van Den Bogaerdt AJ, Kempenaar J, Ponc M, Human adipose tissue-derived cells delay re-epithelialization in comparison with skin fibroblasts in organotypic skin culture. *Br J Dermatol* 150:444-54,2004
 14. Stosich MS, Mao JJ. Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 119:71-83,2007
 15. Xiaobing F, Lijun F, Haihong L, Xiaokun L, Biao C, et al. Adipose tissue extract enhances skin wound healing. *Wound*

Rep Reg 15:540-8,2007

16. Fodil BI, Bizbiz L, Schoevaert D, Robert AM, Robert L. Effect of L-fucose and fucose rich oligo- and polysaccharides (FROP-s) on skin aging : penetration, skin tissue production and fibrillogenesis. *Biomed Pharmacothe* 57:209-15,2003
17. Sara M, Neik AC, Mark N, Raashid H, Raymond C. Imiquimod as an antiaging agent. *J Am Acad Dermatol* 56:422-5,2007
18. Chiba K, Kawakami K, Sone T, Onoue M. Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16:242-51,2003
19. Kligman LH. The hairless mouse model for photoaging. *Clin Dermatol* 14:183-95,1996
20. Donald LB, Daniel PH, Thomas VO. An animal model of solar-aged skin : histological, physical and changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol* 40:367-78,1987
21. Park CH, Lee MJ, Kim JP Yoo ID, Chung JH. Prevention of UV radiation-induced premature skin aging in hairless mice by the novel compound melanocin A. *Photochem Photobiol* 82:574-8,2006
22. Adi A, Mallikarjuna G, Sara B, Lubna Q, Kian B, Yiqun GS, et al. Photoprotective effects of brucillamine against UV-induced damage in an SKH-1 hairless mouse model. *Photochem Photobiol* 84:477-83,2008
23. Vivienne ER, Sitarina W, Diane D, Elaine C, Karen B.

- Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol. *Photochem Photobiol* 81:1548-53, 2005
24. Ai O, Chris E. Relationships between changes in mechanical properties of the skin, wrinkling, and destruction of dermal collagen fiber bundles caused by photoaging. *Skin Res Technol* 12:283-8,2006
25. Hiroaki M, Ichiro K, Tomomi S, Toshiro I. Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator. *Eu J Pharmacol* 411:169-74,2001
26. Manabu K, Yukiko I, Misako K, Takashi N, Keiji I, Kazutami S. Protective effects of an antioxidant derived from serine and vitamin B6 on skin photoaging in hairless mice. *Photochem Photobiol* 81:970-4,2005
27. Karin SK, Peter B, Jutta W, Gernot H, Weijan M, Lale K, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 35:307-16,2000
28. Gary JF, Zengquan W, Subhash CD, James V, Kang SW, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337:1419-28,1997
29. Shinji I, Yukiko M, Satoshi A, Keiko T, Kouji K, Makoto T, et al. Possible involvement of gelatinase in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol* 120:1-7,2003
30. Jessica HR, Adam JM, Patrick JS, Warwick IM, Daniel NS. Photoaging : Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*

55:1-19,2006

31. Kim WS, Park BS, Kim HK, Park JS, Kim KJ, Choi JS. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cell : protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci* 49:133-42,2008
32. Kim WS, Park SH, Ahn SJ, Kim HK, Park JS, Lee GA, et al. Whitening effect of adipose-derived stem cell : a critical role of TGF- β 1. *Biol Pharmacol Bull* 31:606-10,2006

Abstract

Repair effect of human adipose tissue derived stem cell
on photoaged skin in albino hairless mouse

Sae Bin Lee
Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dae Hyun Lew)

There are two independent, clinically and biologically distinct processes affecting the skin aging. The first is the innate or intrinsic aging. The second process is the extrinsic aging, 'photoaging', which is the result of exposure to outdoor elements, especially UVB irradiation.

Photoaged skin is characterized by deep wrinkle, laxity, leathery appearance and telangiectasia. At the histological level, photoaged skin is characterized by hyperplastic epidermis, dermal thickening, loss of mature dermal collagen and deposition of glycosaminoglycans and dystrophic elastotic materials.

Not only the simple surgical procedure, the easy access to the subcutaneous adipose tissue, uncomplicated isolation procedure but also characteristics similar to bone marrow

stem cell or cord blood stem cell make human adipose tissue derived stem cell(hADSC) most attractive for researchers and clinicians.

The report that hADSC proliferated fibroblasts by cell-to-cell direct contact or paracrine effect of secretory factors seems for hADSC to play a compensatory roll for structural and functional loss due to changes of cellular activity

hADSC and DPBS as placebo were intradermally injected to back of UVB irradiated albino hairless mouse. We quantitatively demonstrated that hADSC treatment markedly attenuated parameters for skin wrinkles and depth of both epidermis and dermis. We also demonstrated degraded collagen and elastosis were recoverd histologically by injection of hADSC. Therefore, we conclude hADSC has a potential of improvement in phtoaged skin elicited by UV exposure.

Key Words : UVB, Albino hairless mouse, photoaging, hADSC