

배양된 구강점막 각화상피세포가 누드마우스 피부 창상 치유에 미치는 효과
김현실(연세대학교 치과대학 구강병리학교실), 김남희(연세대학교 치과대학 구강병리학교실),
김진(연세대학교 치과대학 구강병리학교실), 차인호*(연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실)
연세대학교 치과대학 구강병리학교실, 구강악안면외과학교실*, 구강종양연구소, 두뇌한국 21
의과학사업단

THE INDUCTIVE CAPACITY OF PRIMARY CULTURED ORAL MUCOSAL
KERATINOCYTES IN SKIN WOUND HEALING OF ATHYMIC NUDE MICE

Hyun-Sil Kim, Nam-Hee Kim, Jin Kim, In-Ho Cha*

Department of Oral Pathology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery*, Oral Cancer
Research Institute, Yonsei University College of Dentistry, Brain Korea 21 project for Medical
Science

원저

통신저자 : 차인호

120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

In-Ho Cha

Dept. of OMFS, Yonsei University College of Dentistry

134, Shinchon-Dong, Seodaemoon-Gu, Seoul, 120-752, Korea

Tel: 82-2-361-8764

Fax: 82-2-364-0992

E-mail: cha8764@yumc.yonsei.ac.kr

이 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (02-PJI-PG3-20507-0026)의 지원으로 수행되었
음.

별책부수: 30부

<Abstract>

Aim: The aim of this study was to investigate the mechanism of promoted skin wound healing in skin defects with primary cultured oral mucosal keratinocytes.

Materials and methods: Thirty adult female nude mice weighing 20 ± 2 g were used for the experiment. Primary cultured and suspended oral mucosal keratinocytes, labeled with BrdU, were scattered onto $1.5\text{cm}\times 1.5\text{cm}$ sized full thickness skin defects in the experimental group(N=15), and no grafts were placed the control group(N=15). They were sacrificed at 3 days, 1 week and 2 weeks after the treatment respectively. Histological examination of each wounds were performed to review the healing progress on measuring the length from the wound margin to regenerating epithelial front. The role of keratinocytes were assessed by double immunohistochemical staining with Anti-BrdU and Anti-cytokeratin AE1/3.

Results: In the experimental group the wound was completely covered with regenerating epithelia in 2 weeks, but partially regenerated in the control group. The immunohistochemical studies unexpectedly reveal that most of regenerating epithelial cells were induced from marginal epithelium of the margin, not from the scattered keratinocytes.

Conclusion: We could successfully confirm that graft of primary cultured oral mucosal keratinocytes promotes the regeneration of skin defects.

Key Words : Oral mucosal keratinocyte, Primary culture, Wound healing, Tissue engineering

I. 서론

1980년대부터 많은 연구자들이 조직 공학을 이용한 인공피부 개발에 주력해 왔다¹⁾. 구강점막에 관심이 있는 많은 연구자들이 자가점막 배양에 성공하였으나^{2,3,4)} 아직도 배양된 인공점막을 어떻게 이식할 부위에 이동시킬 것인지에 대한 많은 논란이 있다.

일차 배양으로 재건한 상피는 상피의 각질 분화가 일어나지 않고⁵⁾ 단층으로 성장하여⁶⁾ 정상 생체조직과는 많은 차이를 보인다. 이러한 한계를 극복하기 위해 최근에는 진피 유사체를 이용하여 상피의 삼차원적 재건을 위한 시도가 활발히 이루어지고 있다. Tsunenaga 등⁷⁾은 제 1형 교원질과 섬유모세포로 인공 결체조직을 구성하여 피부 상피 세포를 organotypic culture한 결과 *in vivo* 상태와 유사한 기저 세포층, 극세포층, 각화층의 삼차원적 상피가 얻어졌다고 보고하였다. Fujiyama 등⁸⁾은 방광 점막을 이용하여 삼차원적 collagen gel culture를 시행한 실험에서 제 1형 교원질과 섬유모세포로 하부 결체조직을 형성한 후 방광 점막 상피를 배양하였을 때 여러 층의 transitional cell이 자라고 기저 세포층에 극성이 재현되는 것을 보고하면서, 섬유모세포와 collagen gel 사이의 상호작용이 방광 상피의 분화를 유도한 것이라고 주장하였다. 차 등⁹⁾은 제 1형 교원질과 섬유세포로 구성된 진피 유사체 상에 구강점막 각화상피세포를 배양하여 부전각화 중층상피를 재현하였고, 우태아 혈청의 농도와 배지 내의 칼슘의 농도가 구강점막 상피의 삼차원적 배양에 중요한 요소임을 밝혔다.

지금까지 배양 세포 이식을 위한 조직 공학적 접근방법들은 세포들을 정상 구강점막 조직과 유사하게 중층으로 재건하고 비계(scaffold)를 이용하여 재건된 형태 그대로 이식하려는 노력이었다. 그러나 아무리 조직 공학이 발달한다고 해도 과정이 복잡하거나 많은 시간이 필요하면 그 효용성이 낮아진다.

상피의 분화(differentiation)와 상피 특성(epithelial specificity)의 유지는 직접적으로 하방 간엽조직(underlying mesenchymal tissue)에 의해 좌우되는 상피간엽조직 상호작용(epitheliomesenchymal interaction)에 의해 이루어지므로^{10,11)} 상피하방 조직의 재건 없이 상피만을 이식하는 방법으로 정상 조직의 상피 특성의 연속성을 유지할 수 있다¹²⁾. 그러므로 일차 배양된 상피세포를 이용한 창상 치유의 기전을 밝히면 형태 및 구조적 재건 없이 일차 배양만으로 단순하고 빠르게 배양하고 배양된 세포를 간단하게 이동시킬 수 있어 효과적으로 배양 세포를 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

이를 위해 본 연구에서는 일차 배양된 구강점막 각화상피세포를 누드마우스의 피부 창상에 이식하였을 때, 이식된 배양 세포가 생착되어 창상치유를 돕는 것인지 혹은 이식된 세포는 사멸(apoptosis)되면서 주위에서 정상적인 세포가 성장할 수 있도록 유도(induction)하는 지를 규명하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

가. 실험 동물

생후 8주된 $20 \pm 2g$ 의 암컷 누드마우스(Balb/c Slc-nu, Japan SLC, Inc) 30마리를 각각 15마리씩 대조군과 실험군으로 나누었다.

나. 구강점막 각화상피세포

(1) 구강점막 각화상피세포의 일차 배양

구강 상피조직은 제 3 대구치 발거 시 염증이 없는 부위를 환자 동의 하에 채득한 후 Phosphate buffer saline(PBS)로 3회 이상 세척하고, 1~2mm크기로 잘게 잘라 0.15% collagenase - dispase(Boehringer Mannheim, Germany)로 1시간 처리하였다. 입체 현미경 하에서 상피와 결합 조직을 조직 겹자로 분리한 후 상피는 0.25% trypsin/ethylenediamine tetra acetic acid(GIBCO BRL, U.S.A.)용액에 15분간 처리하여 원심 분리하였다. 구강점막 각화상피세포를 모아 Ca^{2+} supplemented 0.15mM Keratinocyte Growth Medium(Clonetics, U.S.A.) 위에 분주하였다. 배지는 3일마다 교환해 주며 70~80% 정도로 풍성하게 자라면 냉동 보관 또는 계대 배양을 하였다. 배지는 Keratinocyte basal medium(Clonetics, U.S.A.)-0.15mM Ca^{2+} , 7.5mg/ml Bovine pituitary extract, 0.1 μ g/ml epidermal growth factor(hEGF-B), 5.0mg/ml insulin, 0.5mg/ml hydrocortisone, transferrin, epinephrine, 50mg/ml gentamicin, 50 μ g/ml amphotericin-B가 포함되도록 하였다.

배양된 구강점막 각화상피세포는 3 passage일 때 누드마우스의 피부 창상에 이식해 주었다.

(2) 구강점막 각화상피세포의 배가 시간 측정

BromodeoxyUridine(BrdU)(Sigma, U.S.A.)를 표지하기 위한 시간을 선정하기 위하여, 세포의 N-methylthiotetrazole(MTT)(Sigma, U.S.A.) 분석을 통해 배가 시간(doubling time)을 측정하였다. 30mm millicell(Millipore, U.S.A.) 96 well plate 에 200 μ l 당 3×10^3 개의 구강점막 각화상피세포를 뿌리고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, PBS로 씻어 주었다. 각 세포에 MTT 용액을 37°C에서 3시간 처리한 후, 배양액을 버리고 Dimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma, U.S.A.)로 녹여내어 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 방법으로 24, 48, 72, 96시간에 MTT 검사를 시행하였다. 24시간을 기준으로 하여 흡광도가 배가 되는 시간을 계산해 구강점막 각화상피세포의 배가 시간을 측정하였다.

(3) 구강점막 각화상피세포 내의 BrdU 표지

구강점막 각화상피세포에 BrdU를 표지하기 위하여 50~60% 정도 차도록 계대 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 PBS로 두 번 세척하고, 20 μ mol/l BrdU를 새 배지에 첨가하였다. 표지 횟수를 MTT 분석을 통하여 선정하고, 상피세포를 누드마우스에 이식하기 3일 전과 1시간 전에 BrdU를 배지에 첨가하여 표지하였다.

(4) 구강점막 각화상피세포의 유세포 분석(flow cytometry)

배양 세포 주기 분석은 유세포 분석(flow cytometry)을 이용하였다. 구강점막 각화상피세포를 배양하여 세포가 완전히 들어차면 trypsin을 처리하고 원심 분리하여 세포를 모은 후, PBS로 두 번

세척하고, 100% methanol을 첨가하여 4°C에서 최소한 30분 이상 보관하였다. 세포에 차가운 PBS를 첨가하여 세척한 후, 다시 PBS로 두 번 세척하고 0.1mg/ml RNase A를 첨가하여 37°C에 30분간 보관한 후 PBS에 0.05mg/ml propidium iodide(Sigma, U.S.A.)를 넣어 Becton Dickinson FACScan으로 세포 주기를 분석하였다.

2. 연구 방법

가. 실험 동물에 배양된 구강점막 각화상피세포의 이식

BrdU로 표지된 구강점막 각화상피세포에 trypsin을 처리한 후 원심 분리하여 세포를 모으고, 1×10^5 cells/40 μ l 될 수 있도록 배지를 첨가하여 준비하였다. 누드마우스에 피부 결손부를 형성하기 위해 먼저 Ketamine HCl(한국유나이티드, 한국), Pentobarbital sodium(유림, 한국), Flumoxef sodium(일동, 한국)을 각각 25mg씩 복강 내로 투여하였다. 누드마우스의 사지를 고정한 후 등 부위에 근막상방 1.5cm \times 1.5cm 크기의 피부 결손부를 형성하고, 창상 수축 방지를 위해 정사각형의 각 꼭지점과 각 변의 중간지점에 5/0 Mersilk[®](Johnson & Johnson Intl, U.K.)를 이용하여 정상 피부와 결손부 하방의 근육층을 묶어 주었다. 실험군은 배양된 구강점막 각화상피세포를 누드마우스의 결손부위에 골고루 뿌려 주었고, 대조군은 이식하지 않고 자연 치유가 되도록 하였다. 결손부를 고정하기 위하여 대조군과 실험군 모두 바세린을 바른 lense cleaning tissue(Watman, U.K.) 3장을 결손부위에 얹고, Elatex[®](Alcare Co., Japan)로 그 위를 감아 주었다. 대조군과 실험군은 각 군당 5마리씩 3일, 1주, 2주에 조직 생검을 시행하였다.

나. 조직학적 관찰

창상의 치유 과정을 관찰하기 위해 대조군과 실험군에서 피부 창상을 형성한 지 3일, 1주, 2주 후에 에테르로 마취하여 희생한 후, 육안으로 관찰되는 실험 부위가 모두 포함되도록 절개하였다. 생검한 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 8시간 이상 고정하고, 통상적인 방법에 의해 파라핀에 포매한 뒤 4 μ m 두께로 절편을 제작하였다. Hematoxylin & Eosin(H-E)으로 염색하여 광학 현미경으로 조직학적 구조와 상피의 분화를 관찰하였다. 조직학적 관찰은 기저세포층의 책상 배열 극성 및 극세포층의 형성 등을 정상 피부의 소견과 비교하였다.

다. 영상분석기를 이용한 재생된 상피층의 길이 측정 및 통계적 분석

현미경과 CCD 카메라로 연결된 컴퓨터에 조직 소견을 입력하고 Image-pro plus program(Media cybernetics, MD, U.S.A.)을 사용하여 입력된 상을 출력하여 각 슬라이드에서 창상변연에서부터 새로 재생된 상피의 길이를 측정하였다. 영상분석기를 통하여 얻은 각 조직의 재생된 상피층의 길이값을 dBase에 입력하고, 이를 SAS(version 6.4) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 통계학적 분석은 각 표본의 연속된 5개의 슬라이드에 대해 행해졌으며, one-way ANOVA와 paired t-test를 이용하였다($p < 0.05$).

라. 면역조직화학 염색 및 관찰

BrdU와 cytokeratin(CK)에 대한 이중면역조직화학적 염색을 위해 4 μ m의 파라핀 연속절편을

xylene 처리 후 알콜로 단계적으로 함수하였으며 3% 과산화수소용액에서 내인성과산화효소를 제거하고 PBS로 세척하였다. 0.4% pepsin으로 20분간 반응시키고, PBS로 세척하였다. 2N HCl로 30분간 DNA 변성(denaturation)시킨 후, PBS로 세척하고 5:1로 희석한 염소 혈청(goat serum)으로 차단(blocking)하였다. 일차적으로 Anti-BrdU(Sigma, U.S.A.)로 12시간 이상 반응시켰다. PBS로 세척한 후 Avidin-Biotin Complex(Sigma, U.S.A.)로 반응시켜 3,3'-diamino-benzidine(DAB)(Vector, U.S.A.)로 발색한 후, 다시 염소 혈청으로 차단하고 Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, Clones AE1/AE3(Anti-CK AE1/3)(Dako, U.S.A.)로 2시간 반응시켰다. 다시 PBS로 세척하고 Avidin-Biotin Complex로 반응시켜서, 3-amino-9 ethyl carbazole(AEC)(Vector, U.S.A.)로 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 음성 대조군으로 일차 항체를 반응시키지 않고 염색한 조직을 사용하였다.

III. 결과

1. 배양된 구강점막 각화상피세포의 생물학적 특성

가. 구강점막 각화상피세포의 배가 시간 측정

배양된 구강점막 각화상피세포가 배로 증가하는 데에는 25시간이 걸렸다(Fig.1).

나. 구강점막 각화상피세포의 BrdU 표지

배양된 구강점막 각화상피세포를 Anti-BrdU를 이용한 면역조직화학 염색을 하였을 때, 99%의 구강점막 각화상피세포가 BrdU 양성으로 관찰되었다(Fig.2).

다. 구강점막 각화상피세포의 유세포 분석

배양된 구강점막 각화상피세포는 세포 주기 중 20%가 증식기(S phase)에 있었다(Fig.3).

2. 조직학적 소견

가. 대조군

(1) 3일 대조군

3일 대조군은 창상변연부에서 결손부위를 향해 상피 재생이 미약하게 일어났으며 결손부위는 급성 염증반응을 보이고 있었다(Fig.1.A).

(2) 1주 대조군

1주 대조군은 창상변연부에서 결손부위를 향해 상피가 재생이 미약하게 일어나고 있었으며 결손부위는 급만성 염증반응과 육아조직 형성을 보였다.

(3) 2주 대조군

2주 대조군은 부분적인 상피의 재생과 육아조직 형성을 보였다(Fig.1.B).

나. 실험군

(1) 3일 실험군

3일 실험군은 창상변연부에서 결손부위를 향해 상피가 활발히 재생되고 있는 소견이 관찰되었으며 결손부위는 급성 염증반응을 보이고 있었다. 재생된 상피의 기저세포층은 책상 배열을 이루고

기저세포는 극성을 띄고 있었다. 극세포층이 생겨나고 있었으나, rete ridge는 관찰되지 않았다. 재생되고 있는 상피 일부에선 세포 군집이 관찰되었다 (Fig.1.C).

(2) 1주 실험군

1주 실험군은 창상변연부에서 결손부위를 향해 상피가 길게 재생되고 있는 소견이 관찰되었으며, 만성 염증반응과 육아조직 형성을 보였다. 일부에서는 상피의 두께는 얇으나 결손부위 전체에 상피화가 일어난 경우도 있었다.

(3) 2주 실험군

2주 실험군은 모두 완전한 상피의 재생을 보였다. 재생된 상피는 정상 피부 상피와 같은 기저세포의 극성과 상피세포로의 분화를 보였으며 대부분 완전각화 소견을 보였으나 부분적으로 부전각화를 보이는 곳도 있었다. 결합조직은 섬유화가 진행되는 소견을 보였다(Fig.1.D).

3. 영상분석기를 이용한 재생된 상피층의 길이 측정

H-E 염색 상에서 창상변연부에서 새로 재생된 상피층까지의 길이를 영상분석기를 이용하여 측정하였을 때 대조군에 비해 실험군에서 빠른 상피의 재생을 보였다(Fig.2, Table 1).

가. 대조군

3일 대조군에서 재생된 상피층의 길이는 평균 0.73mm였다. 1주 대조군에서 재생된 상피층의 길이는 평균 1.88mm로 3일 대조군에 비해 재생되는 상피층의 길이가 증가하여 통계적 유의차를 보였다 ($p<0.05$). 2주 대조군에서 재생된 상피층의 길이는 평균 2.99mm로 3일 대조군, 1주 대조군에 비해 재생되는 상피층의 길이가 증가하여 통계적 유의차를 보였다 ($p<0.05$).

나. 실험군

3일 실험군에서 재생된 상피층의 길이는 평균 3.76 mm로 3일 대조군에 비해 재생되는 상피층의 길이가 증가하여 통계적 유의차를 보였다 ($p<0.05$). 1주 실험군에서 재생된 상피층의 길이는 평균 6.64mm로 3일 실험군과 1주 대조군에 비해 재생되는 상피층의 길이가 증가하여 통계적 유의차를 보였다 ($p<0.05$). 2주 실험군에서 재생된 상피층의 길이는 평균 7.5mm로 3일 실험군, 1주 실험군, 2주 대조군에 비해 재생되는 상피층의 길이가 증가하여 통계적 유의차를 보였다 ($p<0.05$).

4. 면역조직화학적 소견

가. 3일 실험군

3일 실험군에서 CK AE1/3는 기저 세포와 기저상층세포를 제외한 모든 상피층에서 발현되었고 창상변연부에서 재생되는 상피로의 이행부위에 CK AE1/3에 양성인 상피층이 두껍게 관찰되었으나, BrdU에 양성인 세포는 발견되지 않았다(Fig.3.A). 그러나 창상변연과 동떨어진 결손부위에서도 CK AE1/3에 양성인 상피층이 관찰되었으며, 핵이 BrdU에 양성이면서 세포질이 CK AE1/3에 양성을 보이는 세포들이 발견되었다(Fig.3.B).

나. 1주 실험군

1주 실험군은 창상변연부와 재생되는 상피층이 CK AE1/3에 양성을 보였으나, BrdU에 양성인

세포는 관찰되지 않았다(Fig.3.C).

다. 2주 실험군

2주 실험군은 결손부위를 포함한 전체 상피층이 CK AE1/3에 양성을 보였으나, BrdU에 양성인 세포는 관찰되지 않았다(Fig.3.D).

IV. 고찰

자가 구강점막 각화상피세포를 이용하는 방법은 면역학적인 문제가 없고 세포의 반전을(turnover rate)이 빨라서 단기간에 많은 양의 각화상피세포를 배양할 수 있으며, 공여부의 손상이 적다. 최근에 구강점막 상피의 삼차원적 배양과 그 특성에 관한 연구가 진행되었으나⁹⁾, 임상적 적용 시에 물리적 성질의 결여로 인한 조직의 말림과 조작의 어려움, 수축의 문제점 등이 지적되었다.

물리적 성질을 개선시키기 위해 Waymack 등¹³⁾은 배양된 상피 조직을 부분층 판막 위에 적용(Apligraf[®])하였으나 이는 이중 세포 및 단백질질을 사용하게 되는 문제점이 있다. Izumi 등¹⁴⁾은 시체로부터 얻은 진피(AlloDerm[®]) 위에 각화 상피세포를 배양하여 물리적 강도를 높이고자 하였으나 실제 이용에 제한이 많았다. Hollander 등¹⁵⁾은 생분해성 골격인 hyaluronan 위에 자가 각화 상피를 배양하여 광범위한 연조직 손상을 받은 환자에 적용한 후 만족할 만한 결과를 얻었다고 보고하였다. 문¹⁶⁾은 polydioxanone mesh를 이용하여 구강점막 상피를 삼차원적으로 배양하여 인장 강도가 크게 증가되고, 구조적으로도 정상 구강점막 조직과 유사한 결과를 얻었다.

현재까지 자가 상피세포를 채취하여 *in vitro* 상에서 단순 배양이나 삼차원으로 재건하는 방법은 확립된 상태이다. 그러나 이러한 배양 세포를 실제 상처부위에 이동시키는 방법은 연구자마다 차이가 있는데, 이는 이동 매개체로 이용되는 재료에 따른 문제점과 치유 개념의 차이 때문으로 생각된다.

일차 배양된 구강점막 각화상피세포의 창상 치유의 기전에 대한 *in vivo* 연구는 거의 보고된 바 없기 때문에, 배양하여 이식된 세포가 창상 결손부에서 정착되어 치유가 이루어지는 것인지 혹은 이식된 세포는 사멸하면서 주위에서 정상적인 세포가 성장할 수 있도록 유도(induction)하는 지에 대한 규명이 필요하다. 일차 배양된 구강점막 각화상피세포가 유도에 의해 창상 치유를 촉진하는 것이라면, *in vitro* 상에서 상피를 재건하여 이식할 것이 아니라, *in vivo* 상에서 상피간엽조직 상호작용에 따른 상피의 재건이 일어나도록 유도한다면 보다 배양 세포를 효과적으로 사용할 수 있을 것이다.

구강점막 각화상피세포 내로 BrdU를 표지할 시간 간격은 구강점막 각화상피세포의 배가 시간 측정을 통하여 정하였고, Anti-BrdU를 이용한 면역조직화학 염색을 실시하여 표지를 확인하였다. BrdU는 thymidine으로 된 pyrimidine 유사체로 세포 주기 중 S phase 상태인 세포의 DNA에 선택적으로 붙어(incorporation) DNA 합성 중인 세포를 표지할 수 있다고 알려져 있다¹⁷⁾. 이식 직전의 구강점막 각화상피세포에 대해 유세포 분석을 시행하였을 때, 20%가 세포 주기 상의 증식기(S

phase)에 있었으며 BrdU로 표지된 구강점막 각화상피세포가 이식 후에도 존재하게 되어 배양 세포의 추적 관찰이 가능했다.

조직학적 관찰 및 영상분석기를 이용하여 재생된 상피층의 길이를 측정된 결과, 3일 및 1주 대조군은 창상변연부에서 결손부위로의 상피 재생이 미약하고 2주 대조군은 부분적인 상피의 재생을 보였다. 그러나 3일 실험군은 상피의 빠른 재생을 보였고 1주 실험군의 일부에서는 완전한 상피화를, 2주 실험군은 모두에서 완전한 상피의 재생을 보였다. 실험군이 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 빠른 상피세포의 재생이 있었다. 따라서 일차 배양된 구강점막 각화상피세포가 피부 결손부의 창상 치유를 촉진시킨다고 할 수 있다.

BrdU와 CK AE1/3에 대한 이중면역조직화학 염색한 결과, 3일 실험군에서 창상변연부에서 재생되는 상피로의 이행부위에는 CK AE1/3에 양성인 상피층이 두껍게 관찰되었으나 BrdU의 발현을 보이는 세포는 발견되지 않음에 비해, 창상변연부와 동떨어진 결손부위에 핵이 BrdU에 양성이면서 세포질이 CK AE1/3의 발현을 보이는 상피군집이 관찰되었다. 1주 및 2주 실험군은 재생되는 상피층이 CK AE1/3에 양성을 보였으나, BrdU에 양성인 세포는 관찰되지 않았다.

면역조직화학적 검사에서 일차 항체로 사용된 CK AE1/3는 CK AE1이 cytokeratin 10, 13, 14, 15, 16, 19와 CK AE3가 cytokeratin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8과 각각 반응하는 항체로 CK AE1/3는 사람의 거의 모든 cytokeratin과 반응하여 상피 기원의 모든 세포에 대해 발현한다고 알려져 있다¹⁸⁾.

BrdU로 표지하고 누드마우스의 피부결손부에 이식한 일차 배양된 구강점막 각화상피세포는 3일 실험군에서는 BrdU에 양성으로 나타나다가 1주 및 2주 실험군에서는 음성으로 나타났다. 1주 실험군의 일부는 결손부의 중심은 단층(monolayer)인 채 완전히 상피화가 일어난 경우도 있어, 이식된 구강점막 각화상피세포가 창상의 결손부에 존재하다가 1주 이전에 사라지는 것으로 생각된다. 따라서 배양된 구강점막 각화상피세포의 피부 창상 치유의 기전은 이식된 배양 세포의 생착에 의한 치유가 아니라 이식된 세포는 사멸되면서 주위에서 정상적인 세포가 성장할 수 있도록 유도하는 것으로 사료된다.

정상 피부는 기저층에서 생성되는 각화상피세포의 수와 표면에서 떨어져 나가는 세포 수 사이에 균형을 이루고 있으나 실험적으로 배양된 각화상피세포는 과증식된 형태로 나타나며 정상 피부에서는 관찰되지 않는 cytokine을 분비하는 'activated keratinocyte'의 개념으로 설명되고 있다^{19,20)}. 배양된 각화상피세포로부터 분비되는 cytokine은 면역과 염증 반응, 세포 성장 및 분화 조절을 담당하고²¹⁾ 창상 치유와 관련이 있다고 알려져 있다^{22,23)}. 본 연구에서는 실험군에서 이식해 준 배양 세포가 결손부위 내에서 군집을 이루는 소견을 보이고, 창상변연으로부터의 상피의 재생도 빠르게 진행되는 소견을 보였는데, 이는 주변 정상 상피세포 및 섬유모세포에 배양하여 이식한 구강점막 각화상피세포가 cytokine을 분비하여 창상 치유를 촉진시키는 것으로 추측된다.

일차 배양된 세포를 이식하여 재건한 경우의 창상 치유의 기전이 세포가 그곳에서 생착되어 살

아가는 것이 아니라, 배양된 이식세포는 사멸되면서 주위에서 정상적인 세포가 성장할 수 있도록 유도(induction)하는 것이라면 상피간엽조직 상호작용(epitheliomesenchymal interaction)에 따라^{10,11,24)}, 일차 배양한 구강점막 각화상피세포를 구강점막의 재건뿐 아니라 다른 부위의 점막으로도 또한 인공피부로도 간편하게 기능적인 재건을 할 수 있을 것이라고 생각한다.

배양 세포의 passage에 따라 세포의 분화 및 증식 정도가 달라지고 그에 따라 cytokine의 종류와 양이 달라져 전반적인 치유 과정에 미치는 영향도 다를 수 있다고 알려져 있다²¹⁾. 창상의 치유 시기에 따른 cytokine²⁵⁾과 구강점막 각화상피세포 배양 시 시간에 따른 cytokine의 변화를 분석 비교하면 구강점막 각화상피세포 이식 시 적절한 passage의 선택과 추가적인 cytokine의 공급²⁶⁾으로 창상 치유에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 구강점막 각화상피세포를 이용한 창상의 치유 단계에서의 cytokine의 역할을 규명하는 분자 생물학적 연구가 필요하다.

이식된 구강점막 각화상피세포의 운명은 세포 피사나 세포 사멸(apoptosis)로 고려해 볼 수 있다. 그러나, 이의 확인을 위해서는 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay (TUNEL)^{27,28)} 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결론

본 연구에서는 일차 배양된 구강점막 각화상피세포를 BrdU로 표지하고 누드마우스의 피부 창상에 이식한 후, 술후 조직 생검을 실시하고 광학 현미경 검사를 통한 형태학적 특성과 면역조직화학 염색을 통한 생물학적 특성을 아무런 이식을 실시하지 않은 대조군과 비교 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 조직학적 소견 및 영상분석기를 이용한 재생된 상피층의 길이 측정 결과, 3일째 대조군에서는 창상변연부에서 결손부위를 향해 평균 0.73mm의 상피 재생이 일어난 반면 실험군은 이식된 상피군집을 중심으로 활발한 상피 재생을 보이며 평균 3.76mm의 상피 재생을 보였다.

1주째 대조군은 창상변연부에서 결손부위를 향해 평균 1.88mm의 상피 재생이 일어난 반면, 실험군은 평균 6.64mm의 상피 재생을 보였고 일부에서는 상피의 두께는 얇으나 결손부위 전체에 상피화가 일어난 경우도 있었다.

2주째 대조군은 평균 2.99mm의 부분적인 상피의 재생을 보이는 반면, 실험군은 모든 경우에서 창상부위에 완전한 재생을 보였으며 재생된 조직은 정상 피부 조직과 유사한 소견을 보였다.

통계적 분석 상 대조군보다 실험군이, 각 군에서는 3일, 1주, 2주로 갈수록 재생되는 상피층의 길이가 증가하여 통계적 유의차를 보였다($p < 0.05$).

2. BrdU와 CK AE1/3에 대한 이중면역조직화학 검사 결과, 3일째 실험군은 창상변연부에서 재생되는 상피로의 이행부위에 CK AE1/3에 양성인 상피층이 두껍게 관찰되었고 창상변연과 동떨어진 결손부위에서 CK AE1/3에 양성을 보이는 세포군집이 관찰되었다. BrdU에 양성인 세포는 이행부위에는 존재하지 않고 창상변연과 동떨어진 결손부위에서 관찰되었다. 이 세포들은 핵이 BrdU에

양성이면서 세포질은 CK AE1/3에 양성을 보이고 있었다.

1주 및 2주째 실험군은 재생되는 상피층이 CK AE1/3에 양성을 보였으나, BrdU에 양성인 세포는 관찰되지 않았다.

이상의 연구 결과로 일차 배양된 구강점막 각화상피세포는 누드마우스의 피부 결손부의 창상 치유를 촉진시키는 것을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Lee KH.: Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application. *Yonsei Med J.* 2000;41(6):774-9.
2. Lauer G.: Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium. Method and clinical application. *J Craniomaxillofac Surg* 1994;22(1):18-22
3. Lauer G, Schimming R.: Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. *J Oral Maxillofac Surg* 2001;59(2):169-75; discussion 175-7
4. Lauer G, Schimming R, Frankenschmidt A.: Intraoral wound closure with tissue-engineered mucosa: new perspectives for urethra reconstruction with buccal mucosa grafts. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(1):25-33.
5. Arenholt-Bindslev D, Jepsen A, MacCallum DK, Lillie JH.: The growth and structure of human oral keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol.* 1987;88(3):314-9.
6. Southgate J, Williams HK, Trejdosiewicz LK, Hodges GM.: Primary culture of human oral epithelial cells. Growth requirements and expression of differentiated characteristics. *Lab Invest.* 1987;56(2):211-23.
7. Tsunenaga M, Kohno Y, Horii I, Yasumoto S, Huh NH, Tachikawa T, Yoshiki S, Kuroki T.: Growth and differentiation properties of normal and transformed human keratinocytes in organotypic culture. *Jpn J Cancer Res.* 1994;85(3):238-44.
8. Fujiyama C, Masaki Z, Sugihara H.: Reconstruction of the urinary bladder mucosa in three-dimensional collagen gel culture: fibroblast-extracellular matrix interactions on the differentiation of transitional epithelial cells. *J Urol.* 1995;153(6):2060-7.
9. 차인호, 육종인, 손영숙, 이은하, 정소영, 김경주, 김진.: 구강점막 각화 상피의 삼차원적 배양과 재건된 조직의 생물학적 특성. *대한 병리학회지* 2000;34:181-189
10. Mackenzie IC, Hill MW.: Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse skin. *Cell Tissue Res* 1984;235(3):551-9
11. Hall BK.: A role for epithelial-mesenchymal interactions in tail growth/morphogenesis and chondrogenesis in embryonic mice. *Cells Tissues Organs.* 2000;166(1):6-14.
12. Ueda M, Hata K, Horie K, Torii S.: The potential of oral mucosal cells for cultured epithelium: a preliminary report. *Ann Plast Surg* 1995;35(5):498-504
13. Waymack P, Duff RG, Sabolinski M.: The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds.

The Apligraf Burn Study Group. *Burns* 2000;26(7):609-19

14. Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE.: Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res.* 2000;79(3):798-805.

15. Hollander DA, Soranzo C, Falk S, Windolf J.: Extensive traumatic soft tissue loss: reconstruction in severely injured patients using cultured hyaluronan-based three-dimensional dermal and epidermal autografts. *J Trauma.* 2001;50(6):1125-36.

16. 문선재.: 구강점막의 polydioxanone mesh를 이용한 조직 공학적 재건. 석사학위논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2002

17. Gratzner HG, Leif RC, Ingram DJ, Castro A.: The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp Cell Res.* 1975;95(1):88-94.

18. Tseng SC, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Woodcock-Mitchell J, Sun TT.: Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell.* 1982;30(2):361-72.

19. Kupper TS.: The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol.* 1990;94(6 Suppl):146S-150S.

20. Gottlieb AB, Chang CK, Posnett DN, Fanelli B, Tam JP.: Detection of transforming growth factor alpha in normal, malignant, and hyperproliferative human keratinocytes. *J Exp Med.* 1988;167(2):670-5.

22. Andreadis ST, Hamoen KE, Yarmush ML, Morgan JR.: Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system. *FASEB J.* 2001;15(6):898-906.

23. McKay IA, Leigh IM.: Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol.* 1991;124(6):513-8.

24. Lauer G, Schimming R, Gellrich NC, Schmelzeisen R.: Prelaminating the fascial radial forearm flap by using tissue-engineered mucosa: improvement of donor and recipient sites. *Plast Reconstr Surg.* 2001;108(6):1564-72; discussion 1573-5.

25. Falanga V, Isaacs C, Paquette D, Downing G, Kouttab N, Butmarc J, Badiavas E, Hardin-Young J.: Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *J Invest Dermatol.* 2002;119(3):653-60.

26. Robson MC, Phillips TJ, Falanga V, Odenheimer DJ, Parish LC, Jensen JL, Steed DL.:

Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound Repair Regen.* 2001;9(5):347-52.

27. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z.: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 1993;53(8):1945-51.

28. Maruoka Y, Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Kurokawa H, Kajiyama M, Toyoshima K.: Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238(3):886-90.

Table 1. Length of regenerating epithelial front.

Group	(n)	Epithelial Length(mm)	
		mean	standard deviation
Control			
3 day	5	0.73	0.12
1 week	5	1.88	0.36
2 weeks	5	2.99	0.36
Experimental			
3 day	5	3.76	1.21
1 week	5	6.64	0.47
2 weeks	5	7.50	0.00

그림

Fig. 1. (A) Control-3d showed minimal regeneration of epithelium. (B) Control-2w showed partial epithelialization. (C) OMK-3d showed active regeneration of epithelium. (D) OMK-2w showed complete epithelialization.

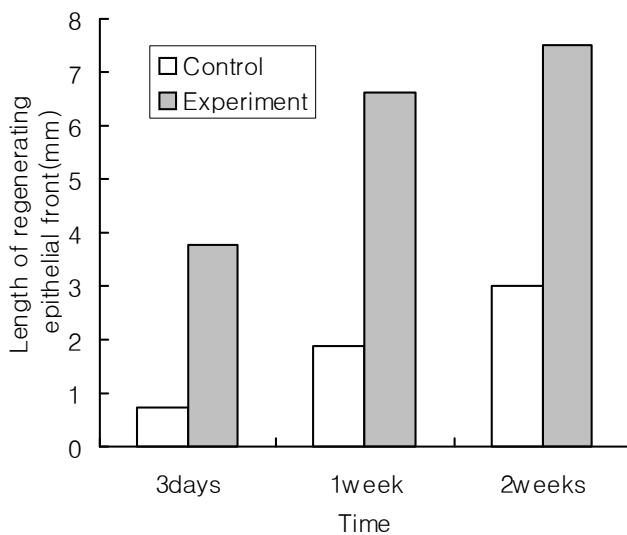


Fig. 2. Measurement of epithelial front by Image-Pro Plus program. The experimental groups showed faster epithelialization than control groups. In experimental groups, the wound was

completely covered with regeneration epithelia in 2 weeks, but was partially regenerated in the control groups.

Fig. 3. (A) Marginal portion of the wound of OMK-3d groups was anti-CK AE1/3(+)/anti-BrdU(-). (BrdU & CK AE1/3, DAB & AEC). (B) Mid-portion of the wound of OMK-3d groups was anti-CK AE1/3(+)/anti-BrdU(+). (BrdU & CK AE1/3, DAB & AEC). (C), (D) The whole regenerating epithelia of OMK-1w, 2w groups were anti-CK AE1/3(+)/anti-BrdU(+). (BrdU & CK AE1/3, DAB & AEC).