

백서에서 자가 구강점막세포와 혈소판 농축 혈장의 이식에 의한 점막 근 피판의 조직공학적 제작

이부규 · 황진혁

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:322-330)

FABRICATION OF TISSUE ENGINEERED MYO-MUCOSAL FLAP BY GRAFTING THE COMPLEX OF AUTOLOGOUS ORAL KERATINOCYTES AND PLATELET RICH PLASMA (PRP) IN A RAT MODEL

Bu Kyu Lee, Jin Hyuk Hwang

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine,
Ulsan University, Seoul Asan Medical Center*

Backgrounds: To overcome limited amount of autogenous mucosa for the reconstruction of various mucosal defect including oral mucosal defect, tissue engineered mucosa has been recently introduced. However, introduced conventional technique of tissue engineered mucosa still have serious pitfalls such as long fabrication time, fragility of the reconstructed mucosa, and complexity of the technique.

Aim of the study: To examine whether the complex of prefluent autologous keratinocytes and autologous PRP (Platelet rich plasma) can reconstruct oral mucosa on the muscular flap with easier and faster way compared to conventional mucosal tissue engineering technique.

Materials and methods: One day before the operation, oral mucosa (3mm in diameter) were taken and treated for extraction of oral keratinocytes according to the routine manner. The day of operation, oral keratinocytes were prepared in the laboratory and then moved to the operating theater. Autologous PRP was also prepared and then mixed with oral keratinocytes just before grafting on the prepared muscular flap. After keratinocyte-PRP complex was seated, then a sterilized rubber sheet was placed on the graft and the elevated skin flap was replaced and sutured. Biopsies were proceeded at 3,5,7,14 and 21 days. Tissue samples were evaluated clinically, histologically, and immunohistochemically.

Results: All of the oral keratinocyte-PRP complexes were successfully grafted on the recipient sites (100%). On 3 days after the operation, 1-2 continuous epithelial layer and many inflammatory cells were observed. On 5 days after the operation, increase of layers of keratinocyte was observed with less inflammatory response. Thickness of the layers was gradually increased from 7 to 21 days after the operation. Cytokeratin confirms epithelium in every specimen.

Conclusions: Prefluent graft of autogenous oral keratinocytes mixed with autogenous PRP have successfully reconstructed myo-mucosal flap. This technique could be a useful alternative for oral mucosal reconstruction in the near future.

Key words: Tissue engineering, Oral mucosa, Platelet rich plasma, Wound healing, Mucosal defect

I. 서 론

구강 악안면 영역에서 악성 종양의 절제수술은 흔히 광범위한 구강점막 조직의 결손을 야기 한다. 이러한 결손을 재건하

기 위해 흔히 피부를 포함하는 복합 피판(skin-bearing composite flaps)이 다양한 방법¹⁻⁶⁾으로 사용되어 왔다. 하지만 구강 내 점막 결손부가 일반 피부조직에 의해 피개 됨에 따라 술 후 구강 내로 털이 자라거나, 과도한 각화가 발생하거나, 점액을 분비하지 못하여 지속적인 구강 내 불편감을 야기 하였고, 또한 피부 공여부에 새로운 창상과 피부 결손을 초래하여 재건 수술 후에도 환자의 삶의 질을 저해하는 많은 문제점을 야기하였다. 이러한 기존의 피부 포함 피판의 단점을 극복하기 위해 구강내 결손부를 점막조직으로 피개시키려는 노력이 시도되었는데, 충분한 양의 점막조직을 얻을 수 있는 공여부가 적절치 않아 임상적으로 효과적이지 못하였고, 아직까지 구강암 절제

이 부 규

138-736, 서울시 송파구 풍납동 388-1

울산대학교 의과대학 서울아산병원 구강악안면외과

Bu Kyu Lee

Dept. of OMFS, College of Medicine, Ulsan Univ. Seoul Asan Medical Center

388-1, Poongnap-dong, Songpa-gu, Seoul, 138-736, Korea

Tel: 82-2-3010-5970 Fax: 82-2-3010-69

E-mail: bukyu67@yahoo.co.kr

후 발생한 구강 내 거대 결손부를 점막조직으로 이장하는 것은 성공을 거두지 못하고 있다.

1975년 적은 양의 피부의 생검을 통해 표피판(epidermal sheet)을 실험실적으로 형성시킨 Reinwald와 Green의 보고⁷⁾ 이후, 이 방법을 구강점막에 응용하여, 자가 구강점막의 일부를 실험실에서 분리 배양한 후 다양한 조건으로 인공 구강 상피막을 형성시켜 이를 이식해 주는 방법으로 구강점막을 재건하려는 실험적, 임상적 연구들이 꾸준히 보고되어왔다^{8,11)}. 하지만 이러한 방법들은 공통적으로 3-4주에 걸친 장시간의 실험실 배양 기간이 소요되었으며, 이에 따른 무균적인 배양환경의 관리의 어려움과 계대 배양이 진행됨에 따라 세포의 분열능력이 감소하고, 표피판이 형성된 후에도 생체에 이식 후 생착율이 떨어지거나, 제작된 상피막이 너무 연약하고, 장상치유 후 과도한 수축을 보이는 등 제작에 들인 노고에 비해 만족스럽지 못한 임상결과를 보여왔다⁹⁾. 이런 전통적인 실험실내 배양의 문제를 극복하기 위해 기존의 실험실내 점막 제작과는 다른 방향으로 pre-confluent keratinocyte grafting이 표피조직공학(epidermal tissue engineering) 분야에 소개되었다¹²⁾. 이 개념은 분리된 자가 점막 각질세포 내에 미분화 각질세포(undifferentiated keratinocytes) 혹은 줄기세포가 존재한다는 전제 하에, 미분화 상태를 유지할 수 있는 조건에서 최소한의 필요 기간만 배양하고 이들의 배양에 가장 적합한 조건인 생체 내로 바로 이식함으로써, 기존의 실험실내 점막제작에 비해 시간을 단축시키고, 이식성공률을 높일 수 있으며, 전체적인 비용을 절감할 수 있다는데 이론적 근거를 둔다. 이런 이론에 기초하여 2001년 이 부규 등¹³⁾은 백서에서 소량의 자가 구강 점막조직에서 각질세포를 분리한 후 pre-confluent grafting의 개념에 기초하여 동 개체의 groin muscle의 상방에 분리된 각질세포를 즉시 이식하여 자가 구강 점막 각질 세포가 빠른 시간 안에 넓은 면적의 근육을 이장(laminating)하는 결과를 보고하면서 현재 구강의 거대 결손부 재건에 gold standard라고 할 수 있는 피부-근 복합 피판에서 피부를 인공 점막으로 대체하여 비교적 단기간 내에 성공적인 인공 점막-근 피판 제작의 가능성을 제시하였다. 하지만 그 보고에서 세포의 carrier로서 Gore-tex를 사용하여 추후의 제거가 용이하지 않았고, 배양 환경이 외기와 접촉이 없는 피하조직이었으며, 신생된 점막이 지나치게 얇고, 분화가 되어 있지 않아 실제 임상에 적용을 위해서는 새로운 carrier의 도입을 포함한 적절한 protocol의 확립이 필요함을 주장하였다.

이에 그 연구에 계속하여, 자각화점막 세포의 새로운 carrier로서, 1997년 Whitman 등²⁹⁾에 의해 구강악안면외과에 처음으로 소개된 뒤, 혈소판에서 분비되는 여러 가지 성장인자로 인해 연조직 및 경조직 치유 및 재생을 촉진하는 것으로 알려져 있는, 혈소판 농축 혈장(Platelet Rich Plasma (PRP))^{24,25)}을 세포의 matrix겸 carrier로 이용하기로 하였으며, 외기와 접촉을 허용하는 환경에서의 배양을 위해 근 피판 상부의 피부와 세포 이식체 상부를 멸균된 고무판으로 분리하고 이를 이용하여 상부 피부판이 완전히 폐쇄되지 않도록 고안 하였다.

본 연구의 목적은 근 피판으로 이용할 부위에 분리된 자가구

강점막세포를 자가PRP와 혼합하여 즉시 이식하고, 근 피판이 비교적 간단한 방법으로 빠른 시간 안에 성공적으로 자가 점막조직으로 이장이 되는지 확인하는 것이며, 본 연구의 결과에 따라 향후 실제 구강암 환자의 결손부 재건에 임상에서의 적용이 용이한 새로운 치료법의 가능성을 제공할 것으로 사료된다.

II. 재료 및 연구방법

1. 실험 동물

본 연구를 위하여 수컷의 실험용 백서(Whistar rat)를 사용하였으며 암컷인 경우에는 호르몬의 변화가 상처 치유과정에 영향을 미칠 수 있으므로 배제하였다. 이들은 실험실 환경에 순응하기 위해 첫 1주일간 표준화된 조건에서 지냈으며, pelleted satandard rodent diet (No.1320, Altromin)을 먹고 libitum이 포함된 tap water를 섭취하였다. 10,000 IU의 광범위 항생제 페니실린을 모든 외과적 시술 전에 투약하였으며 술 후 이틀간 0.2 mg/kg의 양으로 진통제(Buprenorphine HCl)를 투약하였다. 모든 시술과정과 수술기구를 포함한 수술영역은 무균적인 환경이었으며 각각의 수술과정은 ketamine과 rompun을 2:1의 비율로 체중(kg)당 2.5 ml의 용량으로 마취 한 후 시행하였다. 본 실험의 모든 과정은 울산대학교 의과대학 서울 아산병원 임상연구소 동물 실험연구의 규칙에 따라 진행되었다.

2. 구강점막세포의 채취 및 배양

구강 점막 조직편의 채취는 백서의 혀 배측 부위에서 지름 3 mm의 biopsy punch (Stiffel, Germany)로 균일하게 두 개씩 얻었다. 채득된 점막은 1.5 ml epi tube에 항생제가 포함된 0.5 ml phosphate-buffere saline (PBS)에 보관되었다. 이후 PBS를 이용해 3회에 걸쳐 반복하여 세척을 한 후 37 °C에서 30분간 항생제를 포함한 PBS에 담구어 살균처리를 하였다. 표피층을 분리하기 위해 0.5 ml의 Dispase II (Gibco, Mannheim, Germany)와 1 ml의 serum-free keratinocyte growth medium (KGM, Clonetics, SanDiego, CA)를 혼합한 epi tube에 담구어 4 °C의 온도로 1 일 보관시켰다. 이렇게 처리된 점막 조직에서 표피층(epithelial layer)을 무균환경에서 기질층(stromal layer)로부터 벗겨내고 표피층으로부터 세포들을 추출하기 위해 0.25 % trypsin-EDTA sol. (1 ml)(Gibco)에 37 °C로 5 분간 처리하였다. Trypsin을 중화시키기 위해 10 % fetal calf serum (FCS)이 첨가된 PBS에 넣고 세척 과정을 거친 후, 세포 침전물(cell pellet)을 얻기 위해 2000 rpm으로 5분간 원심분리 시켰다. 얻어진 세포 침전물은 재부유화를 위해 10 % FCS를 포함한 PBS에 30분간 처리되었으며 이를 70 μm 나일론 세포 여과기(Falkon, Beckton Dickinson, CA)를 사용하여 세포만을 분리한 후 다시 2000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 세포 침전물을 제외한 용액은 제거한 후 다시 1 ml KGM medium을 첨가하여 최종적인 세포 수를 혈구계를 이용하여 계산하였다. 이후

세포배양을 위해 3~4 ml KGM medium을 매개로 6-well flask(Falcon)에 담귀 37 °C의 온도로 5 % CO₂를 포함하는 가슴이 되는 배양기 (humidified incubator)에서 시술 전까지 평균 2-3 시간 배양하였다.

3. PRP 준비

이식 당일에 백서의 안와하정맥총에서 미세유리관을 삽입하여 약 3 cc의 혈액을 채취하였다(Fig. 1). 혈액은 응고과정을 막기 위해 Citrate가 포함된 튜브에 보관하였으며 이식 2 시간 전에 혈소판 분리과정을 시행하였다. 1000 rpm 으로 20 분간 원심분리하여 일차적으로 혈장과 혈소판을 분리하였고 이것을 4000 rpm 으로 10 분간 이차 원심분리하여 혈소판이 농축된 혈장을 얻었다.

4. 근피판에 이식

마취 후 백서의 등 부위를 제모시킨 다음 백서의 두개 기저 골로부터 척추 정중선을 따라 5 cm 되는 지점에서 외측으로 1.5 cm 떨어져서 좌 우 각각 1 개의 지점을 표시하여 이식부위의 중심을 정하고 철사로 미리 제작한 한 변이 1.5 cm인 정사각형의 창상 마커로 정확히 창상부위를 작도하였다(Fig. 2). 작도된 절개선을 따라 수술용 칼(No.11)을 사용해 피부를 관통하여 근육층 상방까지 절개를 가했고, 이 때 절개선은 3 번에만 가하여 결과적으로 뚜껑문(trap door) 형태로 만들었다. 근막이 노출되면 준비된 세포를 PRP와 혼합하여 약 50 μl에 맞추어 골고루 뿌렸으며 이 때 조작의 편의성과 이식물의 고정성의 증가 및 PRP의 activation을 위해 트롬빈(5000units)(쥬이연제약)을 섞어 주었다. 이식체와 상방의 피부관과의 분리를 위해 멸균 처리된 고무막(rubber sheet)을 위치시켜 주었으며(Fig. 3) 피판의 고정을 위해 네 모서리에 4-0 나일론 봉합사로 봉합을 해주었다. 이식 후 3 일, 5 일, 7 일, 14 일, 21 일에 걸쳐 결과를 관찰하였으

며 이 때 각 각의 시술부위에 대한 임상적 관찰과 염증상태를 평가하였고, 생검을 통한 조직검사를 시행하였다. 한 편 구강점막각화상피세포-PRP복합체의 효과에 대한 대조군으로서 같은 조건으로 생성된 결손부에 아무것도 이식하지 않은 군, PRP 만 이식한 군, 구강점막각화상피세포만을 이식한 군으로 나누어 같은 기간 내에 동일한 조건에서 임상적 관찰과 조직검사를 시행하였다.

5. 조직시편의 고정 및 염색

언어진 조직시편은 채취 즉시 4 % paraformaldehyde용액에 고정되었다. 고정된 시편을 파라핀 왁스에 포매시킨 후 4 μm의 두께로 수직 절편을 만들어서 이를 hematoxilin 과 eosin (H-E)으로 염색하였다. 명시야 현미경(Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 10-200 배율로 이식 성공여부, 염증 반응의 유무, 각질 세포의 형태와 세포 층 수의 평가, 그리고 상피층의 분화정도를 측정하였다. 이식 성공여부는 근 피판 상방에 점막 각질세포의 이장된 형태를 보고 결정하였으며 일정한 연결을 보이면 성공, 그렇지 않으면 실패로 간주하였다.



Fig. 1. Blood sampling via infraorbital venous plexus.



Fig. 2. Transplantation site was marked with surgical wire stent.

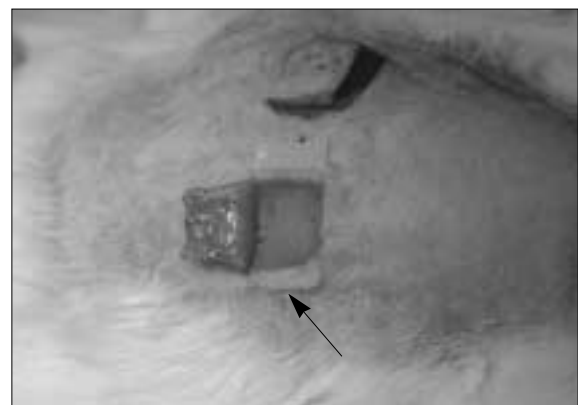


Fig. 3. Rubber drain (arrow) was applied on transplantation site.

6. 면역조직화학적 평가

상피의 확인과 기저층의 확인을 위해 조직절편을 0.5% hydrogen peroxide(in PBS)로 15분간 처리하여 내인성 peroxidase activity를 제거하고 PAP법에 따라 사이토케라틴 (cytokeratin)과 라미닌 (laminin)에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 간략히 설명하면, 조직시편을 gelatin-potassium-chrome-sulfate-coated 슬라이드에 놓고, 일차 항체 (primary antibodies)에 비특이적 결합을 제거하기 위해, 30 분간 0.1 M PBS에 1 % bovine serum albumin (BSA) 포함되어 있는 용액으로 처리하였다. 두었다. AE1/AE3 anticytokeratin monoclonal antibody (DAKO, Glostrup, Denmark)는 1:100, anti-pan cytokeratin monoclonal antibodies (Santa Cruz, CA)는 1:50, anti laminin antibody(Calbiochem)은 1:400으로 희석하여 사용하였으며, 반응시간은 실온에서 4 시간에 걸쳐 적용하였다. 2차 항체로는 anti rabbit IgG(Sigma)를 1:100으로, 3차 항체로는 peroxidase antiperoxidase(PAP, Sigma)를 1:100으로 해서 희석하여 사용하였으며, 각각 실온에서 1시간씩 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 3,3'-diaminobenzidine으로 발색하고 필요에 따라 H-E로 대조염색하였다. 이와 같은 염색을 시행하기에 앞서 2차 항체에 의한 비 특이적 면역염색반응을 배제하기 위하여 1차 항체에 의한 전 처리 없이 2차 항체 만을 사용하여 염색했을 때, 양성 반응이 없음을 확인하였다. 염색 후 각각의 시편에 대하여 각각의 항체에 양성 반응으로 나타난 세포 및 조직의 위치와 분포를 조사하였다.

III. 결 과

- (1) 자가 점막세포 및 PRP의 채취: 2 개의 지름 3 mm의 점막 조각 편에서 평균 20~25 만개의 각질세포가 채득 되었으며 약 3cc- 5cc의 자가혈액에서 164,000-373,000 platelets / μ l

를 함유하고 있는 PRP가 획득되었다. 실험에 사용된 백서 모두 실험 후 각각의 조직 시편 채취 시까지 생존하였으며 모든 창상 부위에서 심각한 감염의 증상은 관찰 되지 않았다.

- (2) 이식 후 3 일째 (Fig. 4, 5): 근 피판 상부에 상피층으로 보이는 얇은 조직을 육안으로 관찰할 수 있었다. 이 조직층은 이식 부위에 얇게 이장되어 있었으며 핀셋과 같은 기구로 인장력을 가했을 때 제거될 수 있을 정도로 약한 결합력을 가지고 있었다. H-E 염색으로 관찰 시 연속된 1-3 개 층 정도의 상피세포층이 관찰되었다. 많은 염증세포의 침윤과 더불어 많은 모세혈관이 관찰되었다.
- (3) 이식 후 5 일째 (Fig. 6, 7): 3 일째 보다 비교적 균일하게 두꺼워 보이는 점막 상피가 형성되어 있는 것이 관찰 되었다. 조직결자로 제거하려고 했을 때 하부 조직과 쉽게 박리가 되지 않았다. H-E 염색에 의한 조직조건상 뚜렷하게 관찰되는 2-4 층의 상피층을 관찰할 수 있었으며 각화가 일어나기 시작한 것이 일부 조직 시편에서 관찰되었다. 염증세포는 드물지만 여전히 광범위하게 관찰되었으나 3 일째의 소견에 비해서는 현저히 줄어 있었다.
- (4) 이식 후 7 일째 (Fig. 8, 9, 10, 11): 육안으로 좀 더 성숙된 질겨 보이는 점막 상피층을 확인할 수 있었으며 기구에 의해 제거되지 않을 인장도의 결합력을 보였다. 현미경 상에 상피층이 3-5개 정도로 늘어났으며, 상피층의 분화 정도에 따라 상피층의 세포들의 모양이 다른 것이 관찰되었다. 염증세포는 더 이상 뚜렷이 관찰되지 않았다. Laminin에 의한 basal cell layer의 염색이 뚜렷이 관찰 되었다.
- (5) 이식 후 14 일째 (Fig. 12): 상피층은 더욱 성숙 되어 졌고 현미경 상으로도 잘 분화된 모습과 더불어 상피화조직도 보다 성숙되어 일반 구강점막하 조직의 양상과 비슷하게 보였다. Laminin에 의한 기저막 부위의 염색이 더욱 뚜렷하

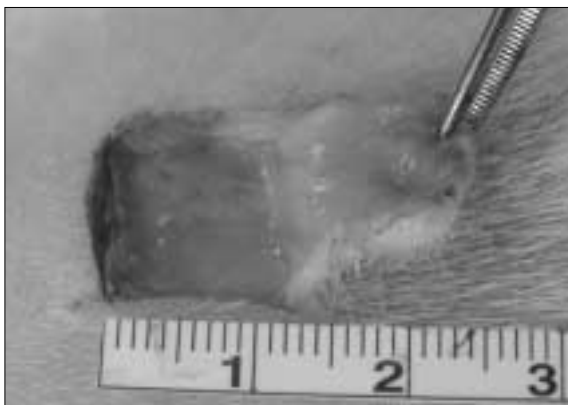


Fig. 4. 3 days after transplantation: a thin epithelial layer can be observed.

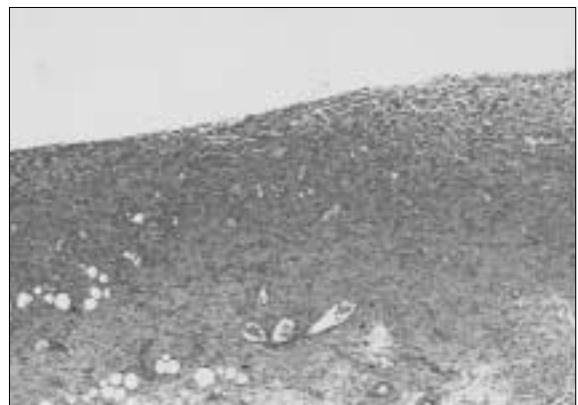


Fig. 5. 3 days after transplantation: Epithelial layer can not clearly identified. Inflammatory cells were dominated on the graft bed. (H-E; original magnification 40 \times)

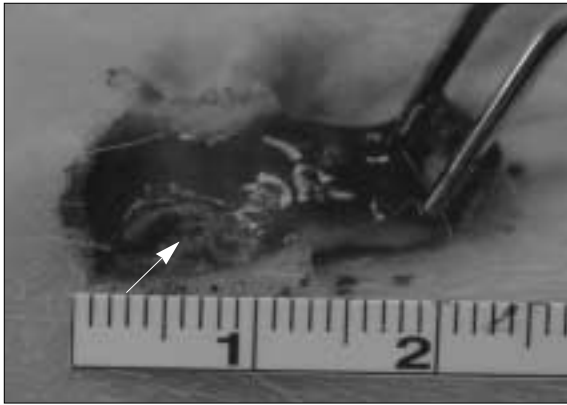


Fig. 6. 5 days after transplantation: Epithelial layer was thicker than that of 3 days (arrow).

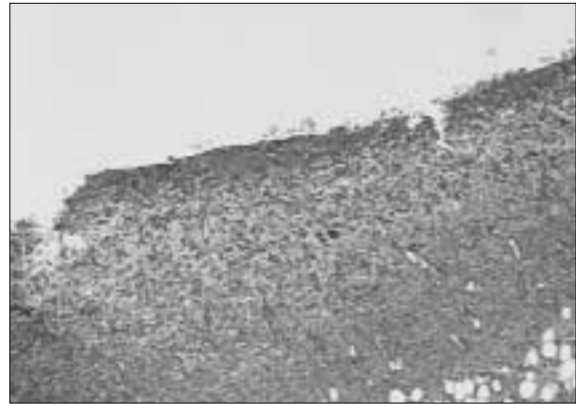


Fig. 7. 5 days after transplantation: Continuous epithelial layer was identified. Inflammatory response was decreased compared to that of 3 days. (H-E; original magnification 40 \times)

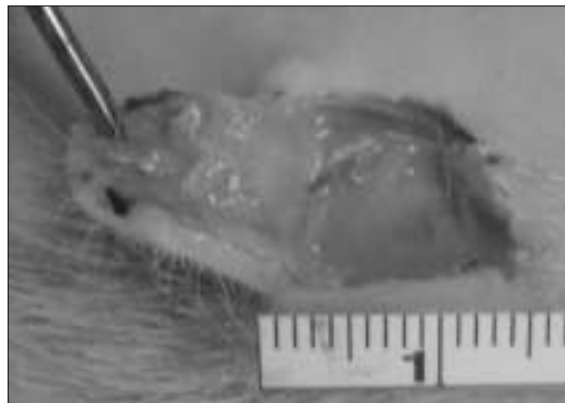


Fig. 8. 7 days after transplantation: Epithelial layer was thick and strong.

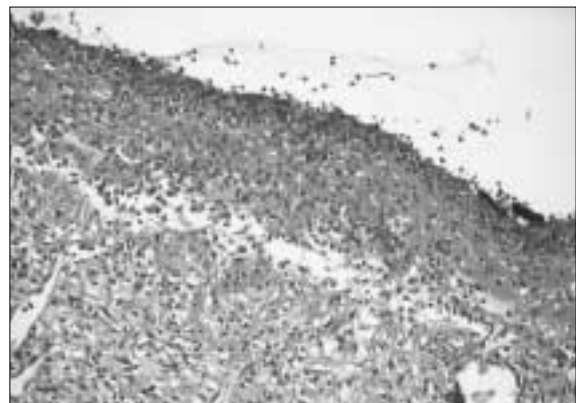


Fig. 9. 7 days after transplantation: three- to four-layer section of keratinocytes was found above the muscle layer. The keratinocytes had a small square cell structure. A layer of connective tissue with fibroblasts and extracellular matrix components was found. (H-E; original magnification 40 \times (left), 100 \times (right))

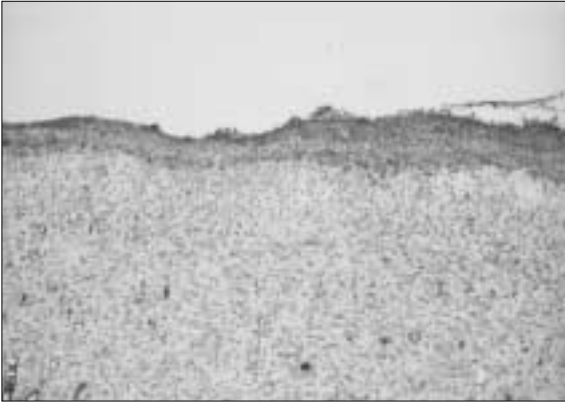


Fig. 10. Cytokeratin 7 days after transplantation: cytoke-
ratin was proven in the epithelium from 1st
week onwards after transplantation (cytoke-
ratin original magnification 100×).



Fig. 11. Laminin 7 days after transplantation: laminin
was proven in the basement membrane like stru-
ctures from 1st week onwards after transplan-
tation (laminin: original magnification 200×).

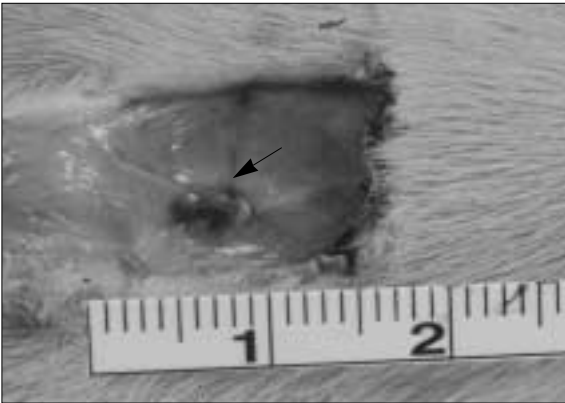


Fig. 12. 14 days after transplantation: Capillaries
(arrow) were observed within matured epithelial
layer.

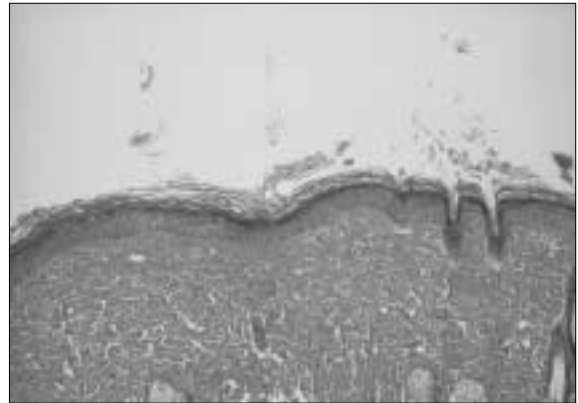


Fig. 13. 21 days after transplantation, an increase of
keratinocyte lining with simultaneous formation of in-
dividual cylindrical cell structures was seen. (H-E;
original magnification 100×).

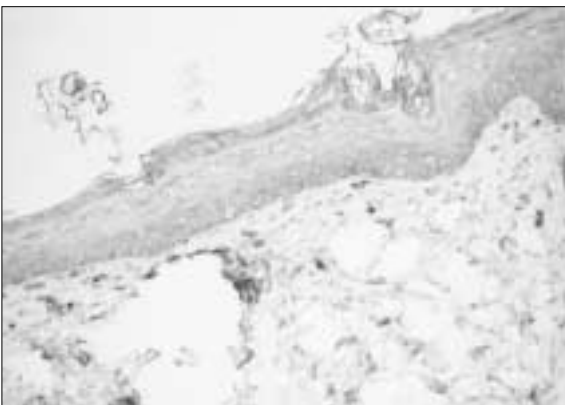


Fig. 14. Cytokeratin 21 days after transplantation:
cytoke-
ratin was proven in the epithelium from 3rd.
week onwards after transplantation (cytoke-
ratin original magnification 100×).

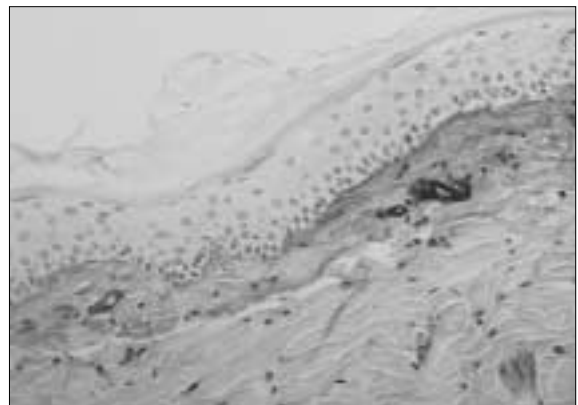


Fig. 15. Laminin 21 days after transplantation:
laminin was proven in the basement membrane like
structures from 3rd. week onwards after transpla-
ntation (laminin: original magnification 200×)

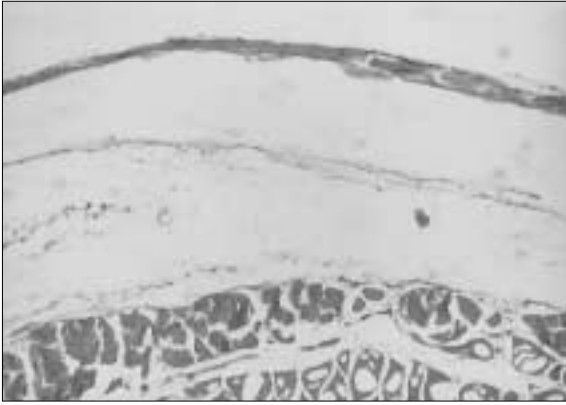


Fig. 16. 21 days of no transplantation: no keratinocyte lining was seen. (H-E; original magnification 100×).



Fig. 17. 21 days after transplantation of PRP only, no keratinocyte lining was seen. (H-E; original magnification 40×).

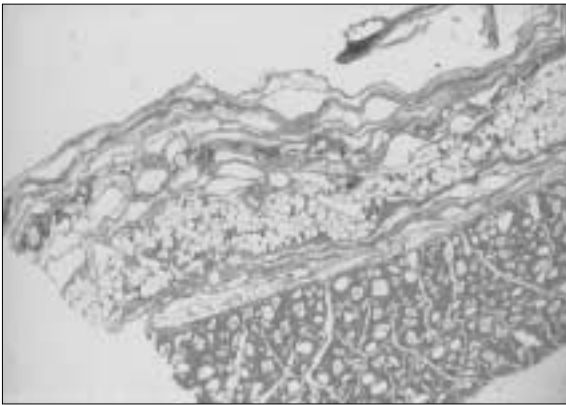


Fig. 18. 21 days after transplantation of oral keratinocytes only, no keratinocyte lining was seen. (H-E; original magnification 40×).

게 관찰되었다.

- (6) 이식 후 21 일째 (Fig. 13, 14, 15): 임상적으로도 매우 견고하고 성숙한 모양의 점막 이장 상태를 보였으며, 조직학적으로 정상 점막과 매우 유사한 정도의 비교적 두꺼운 각화층을 갖는 7-8층의 성숙된 상피세포층이 관찰되었으며 일부 시편에서는 Rete peg와 유사한 형태의 기저막 구조를 확인하였다.
- (7) 대조군에 대한 조직학적 검사에서는 아무것도 이식하지 않은 군, PRP만 이식한 군, 구강점막각화상피세포만 이식한 군 모두에서 조직학적 조사를 완료한 3주차까지 어떠한 cell lining도 관찰 되지 않았다 (Fig. 16, 17, 18).

IV. 고 찰

구강 내 점막 결손부의 점막 근 피판에 의한 재건은, 아직까지 실제임상에서 성공적으로 시도된 적은 없으나, 전통적인

피부 함유 근 피판에 비해 여러 가지 장점을 지닐 것으로 생각된다. 점액의 분비가 가능하고 과도한 각화가 없으며, 재건부위에서 털이 자라지 않으므로, 환자가 느끼는 느낌이 훨씬 자연스러우며, 기능적으로도 연하(swallowing)나 저작(mastication)이 보다 부드러워 구강 내 재건 수술을 받은 환자의 삶의 질을 한 단계 높일 수 있을 것은 명백하다. 특히 조직 공학적인 방법으로 적은 양의 점막을 이용하여 필요한 만큼의 충분한 점막을 제작하여 사용한다면, 공여부의 합병증 가능성마저 거의 예방할 수 있으므로, 피부 피판과 비교하여 그 장점은 비교가 되지 않을 것이다. 최근 조직공학의 발전으로 인공 점막을 제작하려는 시도가 본격화 되고 있으나, 제작에 이은 임상 적용까지의 과정이 복잡하고, 또 시간적, 경제적인 노력에 비해 그다지 만족스런 결과를 얻지 못하였다. 이는 근본적으로 실험실에서 점막세포의 배양 조건이 생체내의 환경을 완벽히 재현하지 못한다는 사실에 기인한다. 상피조직 결손부의 창상치유 시 상피세포는 상피세포만으로 분화를 완성하는 것이 아니고, 정밀하게 조절되는 창상치유 기전에 의하여 끊임없이 주위 조직과 세포들로부터 특이적인 signal을 주고 받으며 치유 기전을 완성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 실험실내에서 단순히 외형만 비슷하게 만든 상피막이 생체 내에 다시 이식되었을 때 원래의 자연스런 상태의 상피조직 상태로 복원이 되려면 아직 우리가 알지 못하는 많은 과정을 거쳐야 하는 것은 자명하다. 본 연구는 실험실적 인공 점막의 이러한 한계를 극복하기 위하여 향후 이식될 근피판 상방에 자가점막세포와 혈소판 농축 혈장을 혼합하여 즉시 이식함으로써 실험실 배양이 아닌 생체배양을 이용하여 점막재건을 시도하였다. 다행히도 기존의 연구에 비해 획기적으로 빠른 시간 내에 보다 성숙하고, 안정적인 상피층을 이루는 것을 확인하였는데, 본 실험에서는 이식 후 3일에 1-2층의 연속성을 가진 상피층을 관찰하였으며, 7일째에 벌써 상피의 분화와 각화가 관찰되었다. 본 연구의 실험동물을 가지고 기존의 방법인 실험실에서 제작된 인공점막을 창상부위에 이식하여 이와 비슷한 결과를 얻으려

면 이식된 점막이 성공적으로 생착 되었다 하더라도, 최소 5-6 주가 소요되는 결과이다. 또한 본 연구의 기본이며 거의 유사한 개념과 조건에서 실시된 이 부류 등의 연구¹²⁾에서도 점막세포의 즉시 이식 후 6-7 일 후에나 1-2 층의 상피층을 이루는 데 불과하였음을 비추어 보면, 본 연구에서 제시한 제작protocol에서 인공점막이 매우 빠르고 효과적으로 생성되었음을 알 수 있다. 본 연구의 결과에서 나타난 신속하고 성숙된 인공상피이장의 이유는 우선 생체 내 배양에 의한 장점과 아울러 PRP 혼합에 의한 혈소판내 성장인자들의 영향일 것으로 추측된다. 일반적으로 혈소판(platelet)은 조직 손상에 반응하여 이를 치유하는 기전의 주요단계인 혈병을 만들 뿐만 아니라 여러 인자들에 의해 활성화되면서 주요 성장인자(growth factors)를 분비하게 된다. 인체의 경우 혈소판이 창상부위에서 기능하는 기간은 5-8 일이며, 성장인자들의 처음 방출이 일어난 후 혈소판의 수명인 약 7 일간 순차적으로 성장인자의 방출이 지속된다. 이 때 분비되는 성장인자들은 PDGF, TGF- β , VEGF, EGF, IGF 등이며 이들은 섬유아세포, 근육세포 분화를 촉진하고 상처 치유 단계 중 혈관생성, 섬유세포 형성, 재상피화에 기여하는 것으로 알려져 있다²⁴⁻²⁶⁾. 그 후 혈소판이 죽어 소멸되면 혈소판의 자극으로 내 증식된 대식세포가 여러 가지 성장인자를 방출하며 부가적인 창상 치유 조절을 지속해 간다. 따라서 본 실험에서 사용된 PRP 내 혈소판의 성장인자들이 이식 초기에 점막의 상피 분화를 촉진시켰으며 이후 이식세포의 안정적인 생착을 일으키는 동시에 상피의 이른 성숙을 유도하였음을 짐작할 수 있다.

아울러 본 연구에 있어서 PRP의 이용은 위에 언급된 적절한 성장인자의 제공 외에 트롬빈의 적용을 통한 응고 작용으로 세포를 안정되게 유지시키고, 이식 과정에서 이식체를 다루기 편하게 하여 이식 후 이식편의 안정성을 부여하는 역할을 하였다. 조직공학의 원칙상 세포가 적절하게 생체로 이식되어 원하는 곳에서 조직을 형성하려면, 적절하게 세포를 운반하고 성장을 유지할 수 있는 matrix 혹은 carrier가 필요하다. 이를 위하여 본 연구의 목적에 부합하는 구강각화세포의 carrier로서 기존의 창상피복제로 검증이 된 생체 친화collagen이나 glycosaminoglycans^{13,14)}, Alloderm®, 친수성 PTFE막 등이 사용될 수 있으나, 이들은 대부분 이종 혹은 동종 물질로서 추후에 이식 부위로부터 제거를 해야 하거나, 생체 내에서 면역반응 이후 흡수되는 과정을 거쳐야 하고 또한 대부분의 재료는 성장인자를 함유하고 있지 않으며, 상대적으로 고가이다.

한편 본 연구의 성공적 결과에 기여한 또 다른 요인은 반 개방 피하조직에서 구강 신생상피의 배양이었다. 이전의 여러 연구들에서 언급되었듯이⁶¹⁵⁾ 생체에 이식 후 인공 표피판이나 표피 세포들은 생착이 완성되기 까지 심각한 정도의 수축을 보였다. 정확한 크기로의 제작이 중요한 조직공학 분야에서 이식편의 과도한 수축은 시술의 성공여부를 가늠할 정도의 중요한 문제이다. 일반적으로 상피가 탈락된 창상의 과도한 수축의 이유는 대기(atmosphere)에 결체조직이 노출되는 것을 최

소화 하기 위한 인체의 자연스런 방어기전 때문인데, 인공점막 이식의 경우 인공점막이 자연점막의 구조에 비해 결체조직의 보호를 위한 구조가 완전하지 못한 것이 일반 피부이식경우 보다 과도한 창상 수축을 보이는 주요한 이유의 하나로 사료된다. 본 실험에서는 PRP-세포 복합체를 피하에 이식 하여, 공기노출을 최소화 하면서도, 적절한 상피조직의 분화를 도모하기 위하여, 고무막을 이용하여 창상부를 완전히 폐쇄하지 않으므로, 일부 공기 노출을 계획하였던 바 결과적으로 전체적인 수축 정도가 적으면서, 분화가 유도된 인공 점막을 제작하게 된 것으로 생각된다. 하지만 향후 이러한 trap door 형태의 정확한 효과에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서 시행한 면역 염색에서 Laminin의 발현을 확인하였는데, Laminin이 혈관내피세포와 세포 외 기질의 상호작용에 있어서 주요한 역할을 하며^{18,19)}, 또한 각질세포와 기저막 간의 반교소체에 의한 연결에서 이항 연결 복합체로서 작용하고 있고^{20,21)} $\alpha\beta3$ 인테그린과 상호 작용하여 혈관형성에 기여²²⁾ 한다는 점에 비추어 볼 때 본 실험에서 이식 후 7일째에 확인된 뚜렷한Laminin발현은 이미 인공점막의 기저막과 상피하조직의 긴밀한 연결과 함께 점막조직이 성숙(maturation)되었음을 나타내며 이는 조직 겹자로 견인하였을 때 확인된 근피판과 점막 조직의 긴밀한 접합을 설명하는 이유라고 생각할 수 있다.

본 연구의 세 가지의 대조군에 있어서, 특이하게도 이식3주 까지도 어떠한 cell lining도 관찰 되지 않았다. 이 결과에서cell만을 이식하였을 경우는 2004년에 발표하였던 연구(당시는 cell을 culture하던 membrane에 붙인 채로 뒤집어서 같이 이식하였음)와는 달리 추출된 소량의 cell을 어떠한 carrier없이 단지 serum에 섞어서 뿌려주었던 관계로 이식부에 안전하게 생착할 수 없는 이식의 기술적인 문제가 중요한 원인으로 생각되며, 특히 아무 것도 이식하지 않았거나, PRP만을 이식하였던 경우에서 어떠한cell lining도 관찰 되지 않은 이유에 대해서는 저자 등이 이전에 실행한 실험에서 동일한 부위와 크기의 전 층 피부 절제 후 secondary intention과 창상수축으로 결손부의 폐쇄가 완료되는 시점이 약 3주정도 걸리는 것에 비추어 볼 때 매우 흥미로운 현상이며, 이는 원래 피부가 결손부를 덮고 있는 한 하부에 주변 상피세포로부터 migration이 일어나지 않는다는 사실을 보여주며, 따라서 본 연구의 실험군에서 생성된 상피세포층이 이식된 구강각화 점막 상피세포의 의하여 생성된 것임을 반증한다고 할 수 있다.

본 연구가 비록 점막-근피판의 조직공학적 제작 이후 현미경적 미세수술을 이용한 실제 이식 부로의 이식 후의 상태에 대해서는 확인을 못하였을지라도 기존의 실험 결과들과 비교하여 볼 때 점막을 포함하는 근 피판의 형성이 보다 안전하고 간단하며, 빠른 시간 내에 이루어진 것을 확인하였으며, 본 연구의 결과로 추후 실제 환자에게서의 쉽게 적용할 수 있는 인공 점막-근 피판의 제작에 대한 구체적인 protocol을 확립하는데 중요한 근거를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

임상에 이용 가능한 점막 근 피관의 제작의 준비 과정으로써의 백서 모델에서 조직공학적 인 방법으로 자가점막조직을 자가 근 피관 상부에서 효율적으로 제작하였다. 기존의 연구와는 달리 이식 전일 구강점막세포를 채취하고, 당일 구강점막 세포를 실험실에서 분리하여 이식하였고, 동시에 이식 당일에 자가 혈액에서 혈소판 농축혈장을 만들어 이를 배양된 세포와 혼합하여 적용한 결과 점막 제작 기간을 단축시켰음에도 불구하고, 보다 성숙된 점막조직을 제작할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 적용한 인공점막-근피관 제작법은 기존의 전통적 실험실내 조직공학적 점막 제작술을 이용한 방법의 한계를 극복하고 실제 임상에 적용하기에 간단하고, 안전하고, 효율적이었으며, 가까운 미래에 구강점막 결손부 재건에 또 다른 대안이 될 것으로 사료된다. 이에 추가적인 연구를 통하여 인체에 적용할 수 있는 제작protocol의 확립이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Alcalde J, Garcia-Tapia R, Espinosa JM, Perez N: Clinical application of free microvascular flaps in reconstructive surgery of the oral cavity. *Acta Otorrinolaringol. Esp* 1994;45:457-460.
- Baumann I, Greschniok A, Bootz F, Kaiserling: Free transplanted, microvascular reanastomosed forearm flap for reconstruction of the mouth cavity and oropharynx. *Clinical and morphologic findings with special reference to reinnervation* 1996; *HNO* 44:616-623
- Bortolani A, Barisoni D, Chiamenti C, Lorenzini M, Pasqualini M: Intra-oral cancer: immediate reconstruction using a free radial forearm flap. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1994;14:29-40.
- Garner WL: Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:135-139.
- Harris PA, Leigh IM, Navsaria HA: Pre-confluent keratinocyte grafting: the future for cultured skin replacements. *Burns* 1998;24:591-593.
- Horch RE, Debus M, Wagner G, Stark GB: Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tissue Eng* 2000;6:53-67.
- Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-343.
- McKay I, Woodward B, Wood K, Navsaria HA, Hoekstra H, Green C: Reconstruction of human skin from glycerol-preserved allodermis and cultured keratinocyte sheets. *Burns* 1994;20Suppl.1:19-22.
- Regauer S, Compton CC: Cultured keratinocyte sheets enhance spontaneous re-epithelialization in a dermal explant model of partial-thickness wound healing. *J Invest Dermatol* 1990;95:341-346.
- A.M. Tomson, J. Scholma, E.H. Blaauw: The effect of detachment of cultured epithelial sheets on cellular ultrastructure and organisation. *Epithelial Cell Biol.* 1995;4:43-51.
- Tsai CY, Ueda M, Hata K, Horie K, Hibino Y, Sugimura Y, Toriyama K, Torii S: Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the oral and maxillofacial region. *J Cranio-Maxillofac Surg* 1997;25:4-8.
- Lee BK, Ries J, Amann K, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S: In Vitro cultured autologous pre-confluent oral keratinocytes for experimental prefabrication of oral mucosa. *Tissue Eng* 2001;33:476.
- Bessho K, Murakami K and Iizuka T: The use of a new bilayer artificial dermis for vestibular extension. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998; 36:457-459.
- Omura S, Mizuki N, Horimoto S, Kawabe R, Fujita K: A newly developed collagen/silicone bilayer membrane as a mucosal substitute: a preliminary report. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1997;35:85-91.
- Sugimura Y, Hata K, Torii S, Ueda M: Transplantation of cultured mucosal epithelium: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 1996;24:352-359.
- Ootani A, Toda S, Fujimoto K, Sugihara H: An air-liquid interface promotes the differentiation of gastric surface mucous cells (GSM06) in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:741-746.
- Yanaga H, Tai Y, Yamauchi T, Mori S, Udoh Y, Yamamoto M: Take percentage and conditions of cultured epithelium were improved when basement membrane of the graft was maintained and anchoring mesh was added. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:105-115
- Baldwin HS: Early embryonic development. *Cardiovasc Res* 1996;31 :34-45.
- Hanahan D: Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48-50.
- Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars LH: The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res* 1994;211:360-367.
- Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H: Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol* 1991;113:907-917.
- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M: Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994;79:1157-1164.
- Whitman DH, Berry RL, Green DM: Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-1299.
- Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS: Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995;13:655.
- Kevy SV, Jacobson MS, Blasetti L, Fagnant A: Preparation of growth factor enriched autologous platelet gel. Presented at the 27th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, St. Paul, Minn., April 26, 2001.
- Spencer EM, Tokunaga A, Hunt KT: Insulinlike growth factor binding protein-3 is present in the granules of platelets. *Endocrinology* 1993;132:996.