

# 태생 및 생후 구순·구개열에 나타나는 조직변성에 대한 성장인자와 세포외 기질 단백질의 면역조직화학적 연구

민봉기·이석근\*·박영욱

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 강릉대학교 치과대학 구강병리학교실\*

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:421-433)

## IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF GROWTH FACTORS AND EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS IN THE DEGENERATING TISSUES OF PRE- AND POSTNATAL HUMAN CLEFT LIP AND PALATE

Bong-Gi Min, Suk-Keun Lee\*, Young-Wook Park

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Pathology\*,  
College of Dentistry, Kangnung National University*

In order to elucidate the pathogenesis of cleft lip and palate, first of all, it is necessary to understand the developmental mechanisms of growth factors and extracellular matrix proteins in the tissues of cleft lip and palate. We have performed immunohistochemical studies on human cleft lip and palate tissues to elucidate the pathogenetic implications of cleft lip and palate. 16 specimens from postnatal human cleft lip and palate subjects and 17 specimens from autopsy of prenatal human cleft lip and palate were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin. The sections were routinely stained by hematoxylin and eosin, also stained by PAS, and followed by immunohistochemical stainings using the antiseras of growth factors and extracellular matrix proteins such as PCNA, S-100, c-erb-B2, MMP-3, MMP-10, HSP-70, transglutininase-C, E-cadherin, VEGF, vWF. Both the prenatal and postnatal specimens of cleft lip and palate showed dysplastic proliferation of the basal cell layer, increased infiltration of melanocytes into mucosal epithelium, sebaceous gland hyperplasia ingrowing into the muscular tissue of lip and palate, and fatty infiltration into the submucosal deep connective tissue. The strong reactions of MMP-3 and HSP-70 were detected in the tissues of cleft lip and palate, especially increased in degenerating muscle bundles, while the immunostainings of PCNA and c-erb-B2 were weakly positive in the tissues of cleft lip and palate. These data suggest that the retrogressive tissue degeneration around the cleft areas persistently exist during the prenatal and postnatal period after cleft formation, and the sebaceous gland hyperplasia and fatty infiltration with the intense expression of MMP-3 and HSP-70 is closely related to the muscular degeneration around the cleft area.

### I. 서 론

구순·구개열은 흔한 선천성 기형이며, 구강악안면외과 영역에서 가장 흔하게 발생하는 기형이다<sup>1)</sup>. 구순·구개열의 원인은 유전적 및 환경적 요인으로 크게 나누고 있지만, 그 정확한 기전이나 이들간의 상호작용 및 복합작용 등에 대해서는 아직도 명확히 알려지지 않고 있으며 논란이 많은 부분이다<sup>2)</sup>. 구개형성과정

(palatogenesis)은 외인성 요소(exogenous factor)와 내인성 요소(endogenous factor)에 의해 이루어지게 되는데, 외인성 요소로는 혀의 위치, 비연골과 1차 구개의 수직 성장, 두개저의 굴곡도, 맥켈씨 연골의 성장이고, 내인성 요소로 세포이주, 상피-간엽 형질전환(transformation), 세포외 기질의 합성과 축적, 세포분열 등이 관여한다<sup>3)</sup>. 내인성 요소인 구개 간엽은 두개 신경능(neural crest cell)에서 유래하여 구개돌기가 횡적으로 자라 근심부 위의 상피가 결합된 후 정중부 상피가 사라지고 간엽 조직이 교통하게 되어 구개가 완성된다<sup>4,5)</sup>. 구순열의 발생은 발생 6주부터 중안면을 형성하는 상악돌기와 내외측 비돌기의 융합과정에서 융합부전의 결과로 발생하는 것으로 알려져 있다. 또한 구개열은 발생 7주말부터 정상적으로는 양측의 구개판(palatal shelves)이 전방에서부터 후방으로 이차구개를 형성하기 위해 성장 융합되는데 이 과정에서 융합부전에 의해 발생

#### 박 영 욱

210-702 강원도 강릉시 지변동 123  
강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실  
Yong-Wook Park

Dept. of OMFs, Dental College, Kangnung National University  
123, Chibyun-Dong, Kangnung-Shi, Kangwon-Do, 210-702, Korea  
Tel : 82-33-640-3183 Fax : 82-33-642-6410  
E-mail : ywpark@kangnung.ac.kr

한다<sup>6,7)</sup>.

구순·구개열의 발생기전을 알아보기 위해 태아의 구순·구개열 조직을 연구한 결과를 보면 발생 시기는 대개 태생 초기이며 초기에는 일단 안면 돌기의 조직이 붙었다가 떨어지는 것이란 학설과 전혀 붙지 못하는 것이란 학설이 있는데 최근에는 조직이 붙었다가 떨어진다는 견해가 가장 유력하다<sup>8)</sup>. 상피화에 이상이 있다는 것은 상피세포의 변형이 생긴 것이며, 일단 조직이 붙었다가 그것이 연결이 되지 못한다는 것은 근육이 연결될 때 하나의 단위(unit)로 작용을 하는데, 근육이 연결되지 못하는 간엽 조직의 미성숙이 그 원인이 될 수 있다. 여러 가지 원인 중에 지나친 섬유화와 근육 세포의 부족, 근육 세포 대신에 지방 조직이 침윤되는 현상들을 태아의 구순·구개열 조직에서 발견을 하였다<sup>9)</sup>.

본 연구에서는 구순·구개열에 대한 발생기전을 알아보기 위하여 기본적으로 구순·구개열 부위 조직에서 발견되는 성장인자와 세포의 기질의 복합적인 작용기전을 이해하는 것이 필요하므로, 태생(prenatal) 및 생후(postnatal) 사람의 구순·구개열 조직에서 간엽 또는 상피 조직의 변화를 면역조직화학적 염색방법을 통하여 관찰 및 연구하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

서울대학병원 소아병리과에서 시행한 구순·구개열을 가진 사망한 태아의 조직 부검에서 얻어진 태생기 사람의 구순·구개열 조직 17례와 생후 사람의 구순·구개열 성형술을 통해 얻어진 조직 16례를 사용하여 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀 절편을 제작하여 헤마톡실린과 에오진 염색으로 관찰하였다. 생후 사람의 구순·구개열 조직 16례는 구개성형술 시 얻어진 조직 10례와 구순성형술 시 얻어진 조직 5례, 반흔개조술 시 얻어진 조직 1례로 구성되었다(Table 1).

### 2. 연구방법

사용된 일차항체는 생쥐에서 얻은 단일클론성항체인 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)와 S-100, MMP-3(matrix metalloproteinase-3), MMP-10, TGase-C (transglutaminase-C), E-cadherin, VEGF(vascular endothelial growth factor), 토끼에서 얻은 단일클론성항체인 c-erb-B2와 토끼에서 얻은 복합클론성항체인 HSP-70(heat shock protein-70), vWF(von Willebrand factor)의 항체를 이용하였다. 이차항체로는 단일클론성항체로 anti-mouse와 anti-rabbit이 혼합된 이차항체 IgG를, 복합클론성항체로는 anti-rabbit IgG를 사용하여 Streptavidin-peroxidase 방법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다(DAKO, LSAB K0681, Copenhagen, Denmark) (Table 2).

먼저 조직의 파라핀을 제거하기 위하여 자일렌에 15분 담가 둔

다음 100%, 95%, 85%, 70%의 에탄올로 수화시켰다. 그리고 0.3%의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 5분간 차단(blocking)시킨 후 PBS로 씻어 내었고, 일차항체를 4°C에서 밤새 결합(hybridization)시킨 다음, 이차항체로 항온에서 30분간 배양하였다. 그런 후 streptavidin으로 다시 30분간 항온에서 처리하고 diaminobenzidine(DAB)으로 5분여간 발색을 시켰다. 발색이 약한 조직은 대조 염색을 하였다. 발현된 양성반응의 결과는 현미경 사진과 Image Pro-4.0의 Image analyzer 영상처리를 통하여 양성 반응 정도를 분석하였다.

## III 연구결과

### 1. 조직병리학적 소견

1) 태생 구순·구개열 조직의 소견(Table 1, Fig. 1)

(1) 피지선(sebaceous gland)의 증식

태생 구순·구개열 조직 17례 중 9례에서 infundibular follicle cyst를 동반한 피지선의 과증식(hyperplasia)이 관찰되었다. 그러나 근처의 정상 피부 표피에서는 구순·구개열 부위에서 보이는 피지선의 과성장과 infundibular follicle cyst의 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 1, b1-5).

(2) 지방조직의 침윤

태생 구순·구개열 조직 17례 중 9례에서 근육세포 대신에 지방조직이 침윤되는 것을 관찰되었다. 그러나 근처의 정상 피부 표피에서는 구순·구개열 부위에서 보이는 지방조직의 침윤은 관찰되지 않았다(Fig. 1, c1-4).

2) 생후 구순·구개열 조직의 소견(Table 3, Fig. 3)

생후 구순·구개열 조직에서는 다음과 같은 여섯 가지의 특징적인 소견을 관찰 할 수 있었다.

(1) 기저세포 층의 증식

생후 구순·구개열 조직 16례 중 14례에서 기저세포 층의 심한 과증식 양상이 관찰되었으며, 2례에서는 약간의 과증식이 관찰되었다. 기저세포층의 과증식은 연령이 낮을수록 그 양상이 뚜렷하였고, 연령이 증가할수록 뚜렷하게는 관찰되지 않았다(Fig. 3, a1-2).

(2) 모반세포(melanocyte)의 침윤

생후 구순·구개열 조직 16례 중 4례에서 근처의 모반세포가 구강 점막상피 안으로 침윤 증식하는 것을 관찰하였으며, 나머지 12례에서는 약간의 침윤 증식이 관찰되었다(Fig. 3, a1-2).

(3) 피지선과 모낭의 증식

생후 구순·구개열 조직 16례 중 5례에서 모낭(hair follicle)의 과증식이 나타났으며, 그 중 4례에서 피지선이 깊이 침윤 증식하여 근육조직층 가까이까지 분포되었다(Fig. 3, b1-2; d1-3).

**Table 1.** Summary of materials in this study

No.	case	histological characteristics
1	RCM331	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
2	RCM367	non-specific finding
3	RCM373	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
4	RCM516	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
5	A80-6	not examined
6	A80-24	not examined
7	A81-31	not examined
8	A81-54A	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
9	A81-54B	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
10	A82-39	not examined
11	A86-13	within normal limits
12	A87-36	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
13	A87-42	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
14	A87-52	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
15	A87-66	sebaceous gland hyperplasia with infundbular follicle cysts
16	A87-106	within normal limits
17	A88-34	within normal limits

No.	case	age/sex	diagnosis	operation
1	*No.2	21/F	CP	palatorrhapy
2	*No.3	14/M	CL	cheilorrhapy
3	*No.4	4/M	CP	palatorrhapy
4	*No.5	25/F	CP	palatorrhapy
5	*No.6	4/F	CP	palatorrhapy
6	*No.9	6/F	CP	palatorrhapy
7	*No.11	13/F	CP	palatorrhapy
8	*No.19	21/F	CLP	cheilorhinoplasty
9	*No.22	3/F	CL	cheilorrhapy
10	*No.28	26/F	CP	palatorrhapy
11	*No.29	24/M	CL	cheilorrhapy
12	*No.30	30/M	CP	palatorrhapy
13	*No.33	21/F	CP	palatorrhapy
14	*No.35	11/M	CP	palatorrhapy
15	*No.36	8/F	FC	scar revision
16	S2001-118	1/F	CLP	cheilorrhapy

CP: cleft palate, CL: cleft lip, CP: cleft lip & palate, FC: facial cleft

(4) 지방조직의 침윤  
 생후 구순·구개열 조직 16례 중 7례에서 심부의 결체조직 층에서 지방조직의 침윤이 관찰되었다. 지방조직의 침윤은 연령이 증가하여도 지속적으로 관찰되었다(Fig. 3, d1-3).

(5) 점막하 조직의 섬유화  
 모든 조직에서 점막하 조직의 섬유화가 나타났으며, 생후 구순·구개열 조직 16례 중 10례에서 점막하 결체조직은 두꺼운

섬유화 조직으로 구성되어 있는 것이 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 3, c1-2).

(6) 근육 조직의 변성

생후 구순·구개열 조직 16례 중 7례에서 구순·구개열 근처에 잔존되어 있는 근육조직들이 두꺼운 다발구조를 이루지 못하고 분산되면서 위축되어지는 양상이 관찰되었는데 부분적으로 변성되어지는 근육 세포들이 다수 관찰되었다. 구순·구개열 조

**Table 2.** Antibodies used in this study

name	animal	dilution	type	company
PCNA(proliferating cell nuclear antigen)	M	1:50	monoclonal	Dako
S-100	M	1:100	monoclonal	Neomarkers
c-erb-B2	R	1:100	monoclonal	Dako
MMP-3(matrix metalloproteinase-3)	M	1:25	monoclonal	Neomarkers
MMP-10(matrix metalloproteinase-10)	M	1:100	monoclonal	Neomarkers
HSP-70(heat shock protein-70)	R	1:100	polyclonal	Dako
TGase-C(tansglutaminase-C)	M	1:100	monoclonal	Neomarkers
E-cadherin	M	1:20	monoclonal	Zymed
VEGF(vascular endothelial growth factor)	M	1:100	monoclonal	R&D system
vWF(von Willebrand factor)	R	1:200	polyclonal	Dako

M: mouse, R: rabbit

**Table 3.** Summary of histological characteristics of postnatal cleft group

	postnatal cleft lip and palate group															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
basal layer hyperplasia	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++
hair follicle hyperplasia	-	-	-	-	+	-	-	++	-	+	++	-	-	-	+	-
sebaceous gland hyperplasia	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
melanocyte infiltration	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+	++
fatty infiltration	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
dermal fibrosis	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
muscle degeneration	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-

-: negative, ±: rare, +: slight, ++: moderate, +++: strong

직 근처에서 관찰되어지는 조직 변성 양상은 유아 조직일수록 그 양상이 뚜렷하였고, 연령이 증가할수록 변성 양상은 매우 감소되어 있었다(Fig. 3, c1-2; d1-3).

2. 면역조직화학적 소견

1) 태생 구순·구개열 조직의 소견 (Fig. 2)

(1) MMP-3

태생의 구순·구개열 조직에서 아주 강한 양성 반응이 관찰되었다. 특히 점막 근처에 분포되어 있는 피지선에서 다량의 MMP-3의 발현이 관찰되었다(Fig. 2, b1-2).

(2) HSP-70

태생의 구순·구개열 조직에서 아주 강한 양성 반응이 관찰되었다(Fig. 2, c1-2).

(3) PCNA

태생의 구순·구개열 조직의 기저세포 층에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(Fig. 2, e1-2).

(4) E-cadherin

태생의 구순·구개열 조직에서는 반응이 매우 미약하였다(Fig. 2, d1).

**Table 4.** Expressions of antibodies in immunohistochemical staining

	postnatal cleft lip and palate group															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
PCNA	++	+	+	++	+	+	+	++	++	++	+++	++	+	++	++	++
S-100	+	+	-	+	-	+	+	+	+	±	+	+	±	±	+	±
c-erb-B2	±	+	+	+	+	±	-	+	++	-	+	+	±	+	±	-
MMP-3	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+++	++	++	+++	++	+	++	++	++
MMP-10	++	+	+	+	++	+	±	++	+	+	+	+	+	±	+	+
HSP-70	+++	++	+++	++	++	+++	++	++	+	++	++	+++	++	++	++	++
TGase-C	±	+	±	+	+	-	±	+	+	-	±	±	±	+	+	+
E-cadherin	±	±	+	±	±	-	+	±	±	-	+	±	±	+	+	+
VEGF	+	±	-	±	-	+	-	-	±	-	±	-	+	±	+	±
vWF	+	-	±	-	±	-	±	±	-	±	-	-	-	±	-	-

-: negative, ±: rare, +: slight, ++: moderate, +++: strong

#### (5) VEGF

태생의 구순·구개열 조직에서는 반응이 매우 미약하였다 (Fig. 2, f1).

#### 2) 생후 구순·구개열 조직의 소견 (Table 4, Fig. 4)

##### (1) MMP-3

생후 구순·구개열 조직 16례 중 6례에서 아주 강한 양성 반응을, 8례에서 강한 양성 반응을, 나머지 2례에서도 약간의 양성 반응을 볼 수 있었다. 생후 구순·구개열 점막 근처에 분포되어 있는 피지선에서는 다량의 MMP-3의 발현이 관찰되었으며, 특히 근처의 근육세포들이 MMP-3의 발현과 함께 심한 변성양상을 보였다 (Fig. 4, a1-3; b1-3).

##### (2) MMP-10

생후 구순·구개열 조직 16례 중 3례에서 발현이 두드러지게 나타났으며, 11례에서도 양성 반응을 관찰할 수 있었다.

##### (3) HSP-70

생후 구순·구개열 조직 16례 중 4례에서 변성된 근육 조직에서 아주 강한 양성 반응을, 나머지 12례에서도 강한 양성 반응을 보였다 (Fig. 4, c1-3).

#### (4) PCNA

생후 구순·구개열 조직 16례 중 10례에서 증식성 세포인자인 PCNA는 강한 양성 반응을 보였으며, 나머지 6례에서도 양성 반응을 나타내었다 (Fig. 3, e1-3).

#### (5) E-cadherin

E-cadherin에 의한 점막 상피와 점막하 결체 조직과의 부착 관계 및 재생성 상피적 증식을 관찰하였는데<sup>10)</sup>, 생후 구순·구개열 조직 16례 중 6례에서 구순·구개열 조직 근처 기저세포층 증식 부위에서의 약한 양성 반응을 보였으며, 나머지 10례에서는 반응이 매우 미약하였다 (Fig. 4, d1-3).

#### (6) S-100

생후 구순·구개열 조직 16례 중 10례에서 약한 양성 반응을 보였으며, 나머지 6례에서는 뚜렷한 반응을 보이지 않았다. 생후 구순·구개열 점막 근처에서는 S-100에 의하여 관찰되는 신경 세포의 분포가 비교적 빈약하였으며 상피세포 내의 Langerhans 세포의 분포도 매우 감소되어 있었다.

#### (7) TGase-C

근육다발이 점막하 섬유성 근막에 부착하는 것을 관찰하기 위

하여 TGase-C의 발현을 관찰하였는데 생후 구순·구개열 조직 16례 중 8례에서 구순·구개열 점막하 조직의 근육다발에서 약한 양성 반응을 보였으며, 나머지 8례에서는 뚜렷한 반응을 보이지 않았다.

(8) c-erb-B2

EGF receptor의 일종인 oncogene으로 세포성장을 간접적으로 관찰할 수 있는 항원인 c-erb-B2에 대한 염색 결과로는 생후 구순·구개열 조직 16례 중 9례에서 약한 양성 반응을 보였으며, 나머지 7례에서는 뚜렷한 반응을 보이지 않았다<sup>11</sup>.

(9) VEGF

생후 구순·구개열 조직 16례 중 4례에서 약한 양성 반응을 보인 것을 제외하고는 나머지 12례에서는 뚜렷한 반응을 보이지 않았다.

(10) vWF

생후 구순·구개열 조직 16례 중 1례에서 약한 양성 반응을 보인 것을 제외하고는 나머지 15례에서는 뚜렷한 반응을 보이지 않았다.

IV. 고 찰

구순·구개열은 비록 태생기 초반에 이루어지지만 실제로 구개형성과정을 억제하는 요인들과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다<sup>9</sup>. 그 중에는 상피의 연결성 구조, 결합조직의 미성숙, 근육성분의 결손 등의 다양한 구순·구개열 발생 기전이 거론되고 있다<sup>12</sup>. 본 연구에서는 비록 구순·구개열이 다 이루어진 환자의 조직이지만 아직도 구순·구개열을 일으킬 수 있는 여러 가지 요인이 잔존되어 있을 것으로 추측되므로 구순·구개열의 발생기전을 연구하기 위하여 면역조직화학적 연구를 시행하였다.

구순열을 유도하는 일차구개의 비정상적 발생은 이차적으로 이차구개의 융합을 방해한다. 구순열은 정중비둘기와 외측비둘기, 상악돌기 사이의 융합 실패로 나타난다. 이러한 결손의 한가지 가능한 원인으로 돌기의 배측연(ventral ends)이 융합을 위해서로 정상 접촉을 하기 위한 접근 실패가 있는데, 이러한 문제는 한쪽이나 양쪽 돌기의 성장 결함에 의해 일어날 수 있다. 또한 완전 구순열은 정중비둘기와 상악돌기의 간엽세포 증식이 지체될 때 나타나고, 불완전 구순열은 간엽 중심부의 간엽세포 증식이 약간 지체될 때 나타날 수 있다<sup>11</sup>.

구개형성과정은 구개관의 올바른 위치형성, 세포의 기질의 개조(remodeling), 구개관의 융합을 가능케 하는 구개의 상피세포와 간엽세포의 고도로 조절된 상호관계를 포함하는 복잡한 과정이다. 세포막 관련 MMP (MT1-MMP)와 TIMP-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2) 같은 MMP들은 내측연상피(medial edge epithelium; MEE)에서 크게 발현된다. 또한 MMP에 의한 세포의 기질의 단백질용해성 변성(proteolytic degradation)은 구개 융합에 있어 중요한 과정이다<sup>13</sup>.

교원질은 구개발생의 중요한 구성성분으로서, 구개관의 형성과 거상(elevation)시 교원질의 구성과 대사와 같은 세포의 기질의 조절은 구개형성에 중요한 역할을 하고 있는 것이 발표되었다<sup>14</sup>. 이차구개를 가로지르는 간엽세포의 연속성(mesenchymal continuity)에 필요한 과정으로서 내측연 상피의 소실은 구개형성 과정에서의 마지막 중요한 단계이다. 상피-간엽 형질 전환(epithelial-mesenchyme transformation)으로 알려진 과정은 내측연 상피가 간엽으로 전환되는 것을 말한다. 이런 상피-교원질의 접촉은 배아에서 볼 수 있는 상피-간엽 변형 과정 중 아주 중요한 현상이다. 교원질과 같은 세포의 기질의 개조는 결합 조직의 성장과 재형성에서 중요한 과정 중 하나이다. 구개 기질의 주 구성성분인 I형 교원질의 교체(turnover)와 재배열은 구개형성에서 중요한 과정으로 간주된다. 교원질과 교차연결(cross-linking)된 아미노산의 확장과 일시적인 변화가 구개관의 거상 과정에 영향을 줄 수 있는데, 이는 교차연결이 조직에 고유한 경도를 증가시키기 때문이다. 구개의 세포의 기질을 분비하는 간엽세포는 세포의 기질 개조를 초래하는 MMP들을 동원한다. 구개형성 과정 중 I형 교원질과 변성된 교원질 둘 다 분해할 수 있다.

세포유착 단백질(cell adhesion protein) 중 하나인 E-cadherin은 조직형성 과정(histogenesis)과 기관형성 과정(organogenesis)에서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. E-cadherin은 호흡기와 구강상피 뿐만 아니라 구개상피, 치아발생에 관련되는 외배엽과 내배엽 기원의 상피에서 볼 수 있다. E-cadherin의 발현 정도는 연령과 분화도에 따라 증가하며 정상 태아에서는 형성된 비강보다 구강상피에서 보다 높게 발현된다. 그러므로, E-cadherin은 두개안면부 상피의 정상적인 성장 중에서 기능하는 단백질로 알려져 있다<sup>10</sup>.

본 연구에서 생후의 구순·구개열 점막조직에서 기저세포층의 심한 비정상적인 이형성 양상이 관찰되었으며, 모반세포의 침윤이 비정상적으로 관찰되었는데 이는 구순·구개열의 발생원인에 기인하는 중요한 원인으로 생각된다. 일부의 생후 구순·구개열 점막 조직에서 모반세포의 증식과 피지선의 과다증식이 발현되었으며, 이러한 피지선에서는 정상 피부조직에서 보다 풍부한 MMP-3의 발현이 관찰되었다. 대부분의 생후 구순·구개열 조직에서는 결합 조직의 섬유화가 진행되었는데 이는 구순·구개열의 중요한 원인이 될 수 있다고 생각된다. 한편 본 연구결과 생후 구순·구개열 조직의 근육부위에 존재하는 세포들이 위축되어 있음을 관찰할 수 있었다. 이러한 근육세포의 위축은 MMP-3와 HSP-70의 양성반응으로 확인할 수 있었는데, 특히 MMP-3의 발현은 근육세포의 변성과 직접적인 관련이 있는 것으로 나타났다<sup>15</sup>. 따라서 본 연구에서 구순·구개열 조직에서 흔하게 발견되는 MMP-3가 근육세포의 변성과 밀접한 관련이 있을 것으로 추측되었다<sup>16</sup>.

생후 구순·구개열 점막 조직에서 일반적으로 관찰되는 모반세포의 침윤양상은 매우 광범위하게 관찰되었고 이것은 기저세포층의 증식이 심한 경우에 더 증가되어 있었다. 이러한 모반세포의 출현은 일반적으로 UV 광선의 자극, 외상, 니코틴과 같은

화학적 자극에서도 과다하게 침윤되는 것을 알 수 있는데, 본 연구에서도 거의 유사하게 모반세포가 관찰되는 것을 볼 때, 생후 구순·구개열 점막 상피가 자체적인 변성에 의하여 매우 심한 자극을 받고 있다는 것을 암시하고 있다.

구순·구개열 점막 상피의 이형성 증식(dysplastic proliferation)은 비록 구순·구개열이 태생 초기에 이루어졌다 하더라도 내인성의 상피세포의 증식 분화에 장애가 있음을 추정할 수 있는데, 본 연구에서는 구순·구개열 점막 상피뿐 아니라 점막하 결합조직에도 섬유성 상피 조직의 조직화 및 성숙의 장애가 있는 것을 알 수 있었다<sup>27)</sup>. 혈관형성에 관여하는 인자들도 함께 살펴봤는데 특히 점막하 결합조직에는 지방의 침윤을 볼 수 있었고 혈관주위의 지방 조직이 분포되어 있는 것을 관찰하였다. 이러한 경우에 혈관증식에 관여하는 VEGF와 vWF의 발현이 매우 저조하고 특히 작은 모세혈관의 분포가 감소되어 있는 것도 관찰되었다. 따라서 생후 구순·구개열 점막하 결합 조직 내의 심한 섬유화와 지질조직의 침투는 이차적으로 혈관생성 억제 효과(anti-angiogenic effect)를 주는 것으로 추측된다. 이러한 구순·구개열 점막조직의 비정상적인 자극, 상피의 비정상적인 증식 등이 복합적으로 작용하여 상피의 균열을 일으킬 수 있는 것으로 생각된다.

즉 생후의 구순·구개열 조직에서 상피의 기저층이 많이 증식하고 모낭이나 피지선들이 비정상적으로 과증식을 하였다. 이런 상피세포에는 모반세포가 나타나는 현상이 보였으며, 피지선이 근육층 안에까지 침윤되는 것을 관찰하였다. 피지선은 지방 성분을 밖으로 분비해야 하는 기관이지만 안으로 지방을 분비할 때에는 주위의 간엽 조직을 변성시킬 수 있다. 피지선은 여러 가지 단백분해 효소를 많이 분비하는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서는 단백분해 효소로 MMP-3와 MMP-10에 대한 염색을 시행하였는데 MMP-10에 대한 반응은 뚜렷이 나타나지 않았으나 MMP-3에 대한 양성 반응이 뚜렷하게 관찰되었다. 이러한 피지선이 간엽 조직에 지방 성분을 분비하면서 MMP-3가 근육 세포를 변성시키는 것을 발견하였다. 이렇게 피지선이 비정상적으로 증식을 하게 되면 근육세포가 파괴되므로 구순·구개열이 생길 수 있는 환경을 만들 수 있다.

지방 조직이 침윤되는 것은 혈관 조직을 불량하게 만드는 결과를 초래하게 된다. 이는 지방조직이 apolipoprotein을 만들며, apolipoprotein의 kringle domain은 혈관형성을 방해하는 효과가 있다는 것으로 알 수가 있다. 지방 조직이 침윤되면 혈관이 증식을 하지 못하므로 지방 조직이 침윤된 조직의 혈행을 관찰하기 위하여 본 연구에서는 VEGF 염색을 시행하였다. VEGF 염색에서도 이러한 지방 조직이 침윤하는 부위에는 혈관 증식이 별로 없는 것을 관찰 할 수 있었다.

구순·구개열을 발생시킬 수 있는 발생기전으로 상피세포가 붙어서 상피세포의 세포능동사망현상(apoptosis)이 진행되고 간엽 세포가 융합되는 과정에서 이상이 생기는 것을 본 연구에서는 직접적으로 발견할 수는 없었지만, 간엽 세포가 변성되고 상피세포가 비정상적으로 이형성되어 증식하여 서로 붙지 못하게 되는 현상을 만들어 주는 양상이 생후의 구순·구개열 환자에서

계속적으로 존재한다는 것을 확인할 수 있었다.

Tanino 등은 구개성형술에서 두 가지의 경구개 폐쇄술을 비교한 것을 발표하였다<sup>18-20)</sup>. 피부이식과 서골 피관(vomer flap)을 이용한 술식과 구강점막 및 골막 피관(mucoperiosteal flap)을 이용한 push-back 술식을 비교 분석하였는데, 피부이식을 동반한 서골 피관이 비인두 폐쇄에 더 좋은 효과가 있는 것을 발표하였다. 즉 구순·구개열은 단순히 이개 부위의 조직을 절제하고 남아 있는 조직을 연결시키는 술식 보다는 다른 정상 조직의 이식이 더 좋은 결과를 나타낸다는 것을 암시한다. 단순히 구강 점막의 절제를 통하여 남아 있는 구순·구개열의 심부 조직은 계속적인 조직 변성을 일으킬 수 있으며 비구강 누공과 같은 재발이나 지속적인 이개(clefting)의 환경을 유지시킬 수 있다는 것을 본 연구의 결과로 유추해 볼 수 있으며, 이런 구순 구개열 조직의 변성이 더 진행되지 않기 위해서는 구순·구개열 부위에 정상 조직의 이식과 같은 외과적인 조기 치료가 선행되어서 지속적인 근육의 위축이나 변성을 방지하여야 한다.

구순·구개열의 발생은 현재까지 매우 다양한 기전들이 알려져 있고 본 연구에서 조직학적인 염색 및 면역조직화학적 연구를 시행하였지만 모든 것을 다 밝히지는 못하였다. 또한 본 연구에서는 생후에 이미 발생한 구순·구개열 환자의 조직 성향을 주로 관찰하였고, 태생기 조직에서는 부분적으로만 시행한 면역조직화학적 염색의 결과가 생후 조직과 유사한 반응을 나타내었기에 결과를 유추하였으며, 또한 관련된 성장인자와 세포외 기질에 대한 연구만을 시행하였으므로 두개악안면 영역의 복잡한 구조가 서로 조화를 이루어 성장하는 것에 관련된 발생기전에 대한 견해를 설명하는 데에는 한계가 있었다. 앞으로 보다 폭 넓은 구순·구개열의 발생기전에 대한 이해와 생물학적인 또는 분자유전학적인 연구가 시행되어야 될 것으로 여겨진다.

## V. 결 론

태생기 사람의 구순·구개열 조직 17례와 생후 사람의 구순·구개열 환자에서 얻은 조직 16례에서 구순·구개열의 발생기전과 관련된 성장인자와 세포외 기질에 대한 면역조직화학적 연구를 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다

- 1 태생 및 생후 구순 구개열 조직에서 모두 기저세포 층의 증식, 모반세포의 침윤, 피지선과 모낭의 증식, 지방조직의 침윤, 점막하 조직의 섬유화, 근육 조직의 변성을 관찰 할 수 있었다.
- 2 태생 및 생후 구순 구개열 조직에서 시행한 면역조직화학적 염색에서 MMP-3, HSP-70, MMP-10, PCNA의 발현이 강하게 나타났으며, S-100과 TGase-C, c-erb-B2, E-cadherin, VEGF, vWF의 발현에서는 미약한 반응을 보였다.
- 3 생후 구순 구개열 환자의 점막하 조직에서 잔존되어 있는 상피조직, 결합조직 및 근육조직의 저조한 조직세포의 분화도와 불량한 조직의 성숙도가 지속적으로 관찰되었다.

위의 결과로부터 구순 구개열 조직의 변성이 더 진행되지 않기 위해서는 외과적인 조기 치료가 선행되어서 지속적인 근육의 위축이나 변성을 방지하여야 할 것으로 사료되는 바이다.

## 참고문헌

1. Kirschner RE, LaRossa D: Cleft lip and palate. *Otolaryngol Clin North Am* 2000;33:1191-1215.
2. Perrotin F, de Poncheville LM, Marret H, Paillet C, Lansac J, Body G: Chromosomal defects and associated malformations in fetal cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;99:19-24.
3. Ferguson MW: Palate development. *Development* 1988;103:41-60.
4. Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, Shuler CF: Transforming growth factor-beta 3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev Dyn* 1997;209:255-260.
5. Shuler CF, Halpern DE, Guo Y, Sank AC: Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation in vivo. *Dev Biol* 1992;154:318-330.
6. Bienengraber V, Malek F, Fanghanel J, Kundt G: Disturbances of palatogenesis and their prophylaxis in animal experiments. *Anat Anz* 1999;181:111-115.
7. Yano H, Yoshimoto H, Ohtsuru A, Ito M, Yamashita S, Fujii T: Characterization of cultured rat embryonic palatal mesenchymal cells. *Cleft Palate Craniofac J* 1996;33:379-384.
8. Lee SK, Kim YS, Jo YA, Seo JW, Chi JG: Prenatal development of cranial base in normal Korean fetuses. *Anat Rec* 1996;246:524-534.
9. Lee SK, Kim YS, Lim CY, Chi JG: Prenatal growth pattern of the human maxilla. *Acta Anat* 1992;145:1-10.
10. Luning C, Rass A, Rozell B, Wroblewski J, Obrink B: Expression of E-cadherin during craniofacial development. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1994;14:207-216.
11. Wang KY, Chang FH, Chiang CP, Chen KC, Kuo MYP: Temporal and spatial expression of erbB4 in ectodermal and mesenchymal cells during primary palatogenesis in noncleft and cleft strains of mice. *J Oral Pathol Med* 1998;27:141-146.
12. Martinez-Alvarez C, Bonelli R, Tudela C, Gato A, Mena J, O'Kane S, Ferguson MW: Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion. *Int J Dev Biol* 2000;44:331-335.
13. Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, DeClerck YA, Kaartinen V: TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 2001;12:1457-1466.
14. Mansell JP, Kerrigan J, McGill J, Bailey J, TeKoppele J, Sandy JR: Temporal changes in collagen composition and metabolism during rodent palatogenesis. *Mech Ageing Dev* 2000;119:49-62.
15. Morris-Wiman J, Du Y, Brinkley L: Occurrence and temporal variation in matrix metalloproteinases and their inhibitors during murine secondary palatal morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1999;19:201-212.
16. Trotman CA, Hou D, Burdi AR, Cohen SR, Carlson DS: Histomorphologic analysis of the soft palate musculature in prenatal cleft and noncleft A/Jax mice. *Cleft Palate Craniofac J* 1995;32:455-462.
17. Singh GD, Johnston J, Ma W, Lozanoff S: Cleft palate formation in fetal Br mice with midfacial retrusion:



## 사진부도 설명

Fig. 1. Histological characteristics of prenatal human cleft lip and palate

- a1. Normal control; muscular layer (arrow) (X100)
- a2. Normal control (X200)
- a3. Normal control; high magnification of a2, OOM: orbicularis oris muscle (X400)
- b1. Cleft lip; cleft area (arrow) (X10)
- b2. Cleft lip; muscular layer (arrow), F: fatty tissue (X100)
- b3. Cleft lip; infundibular follicular cyst (X200)
- b4. Cleft lip; high magnification of b3, infundibular follicular cyst, sebaceous gland (arrow) (X400)
- b5. Cleft lip; sebaceous gland (arrows) (X200)
- c1. Cleft lip; high magnification of b2, degeneration of muscle bundle showed around infiltration of fatty tissue (arrow), F: fatty tissue (X400)
- c2. Cleft lip; degeneration of muscle bundle showed around infiltration of fatty tissue (arrow), F: fatty tissue (X400)
- c3. Cleft lip; degeneration of muscle bundle showed around infiltration of fatty tissue (arrow), F: fatty tissue (X400)
- c4. Cleft lip; degeneration of muscle bundle showed around infiltration of fatty tissue (arrow), F: fatty tissue (X400)

Fig. 2. Expression of antibodies in immunostaining of prenatal human cleft lip and palate

- a1. H&E; (X100)
- a2. H&E; sebaceous glands (X200)
- a3. H&E; degeneration of muscle bundles showed around sebaceous gland (X200)
- a4. H&E; high magnification of a3, degeneration of muscle bundles showed around sebaceous gland (X400)
- b1. MMP-3; (X200)
- b2. MMP-3; high magnification of b1, highly positive reaction in sebaceous gland (arrow) (X400)
- c1. HSP-70; (X200)
- c2. HSP-70; high magnification of c1, highly positive reaction in sebaceous gland (arrows) (X400)
- d1. E-cadherin; slight positive reaction in adjacent normal tissue (arrows) (X100)
- e1. PCNA; (X100)
- e2. PCNA; high magnification of e1, strong positive reaction in basal cell layer and sebaceous gland (arrows) (X400)
- f1. VEGF; weakly positive reaction (X100)

Fig. 3. Histological characteristics of postnatal human cleft lip and palate

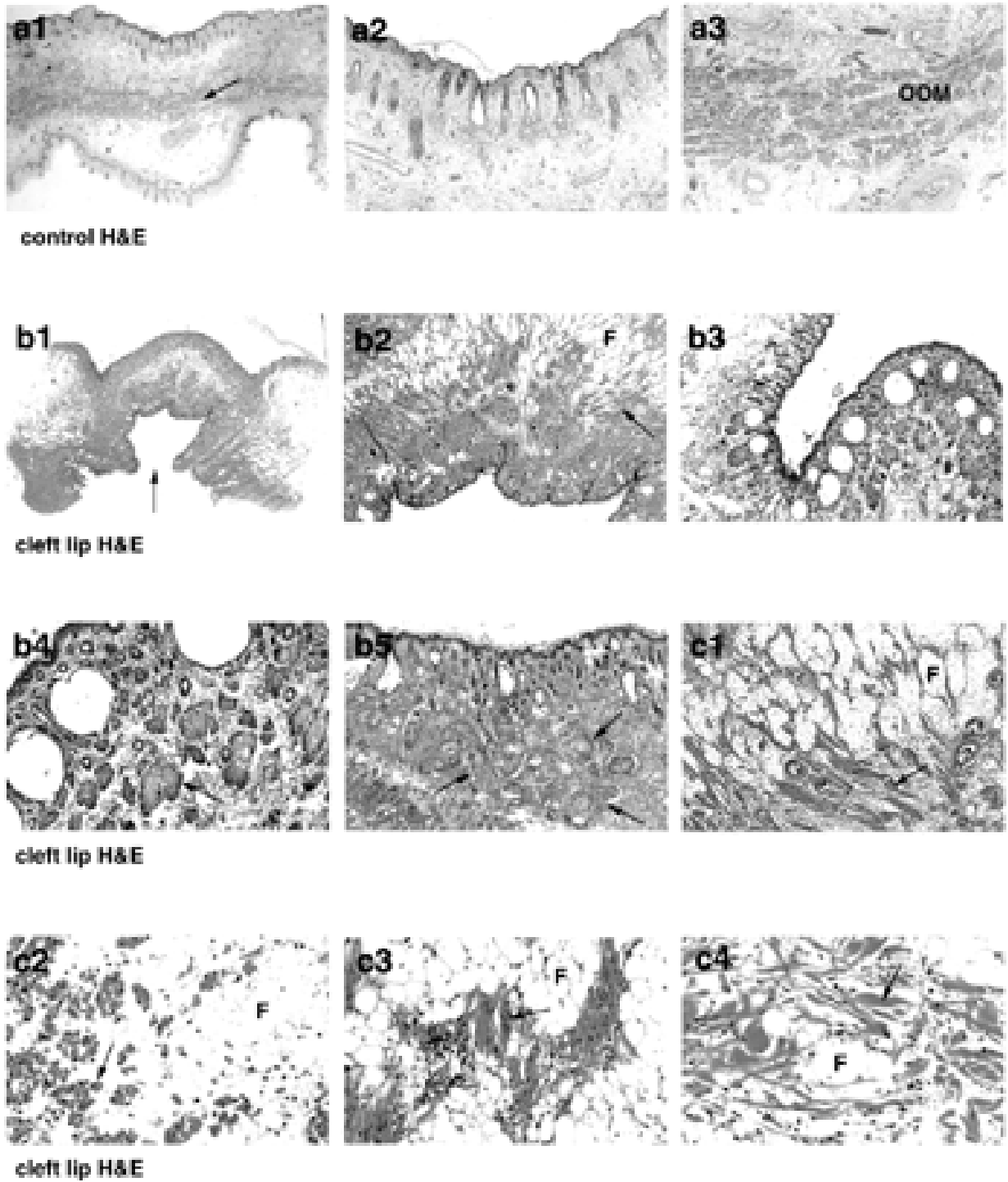
- a1. H&E; (X100)
- a2. H&E; infiltration of melanocytes showed in basal cell layer (arrows) (X200)
- b1. H&E; sebaceous gland (arrow) (X100)
- b2. H&E; high magnification of b1, S: sebaceous glands (X400)
- c1. H&E; (X100)
- c2. H&E; high magnification of c1, degeneration of muscle bundles (arrows) (X400)
- d1. H&E; S: sebaceous glands (X100)
- d2. H&E; S: sebaceous glands (X200)
- d3. H&E; high magnification of d2, degeneration of muscle bundles (arrows), S: sebaceous glands (X400)
- e1. PCNA; (X100)
- e2. PCNA; high magnification of e1 (X400)
- e3. PCNA; high magnification of e1, strong positive reaction in sebaceous gland (arrows) (X400)

Fig. 4. Expression of antibodies in immunostaining of postnatal human cleft lip and palate

- a1. MMP-3; (X100)
- a2. MMP-3; positive reaction in the degenerating muscle bundle (arrow) (X200)
- a3. MMP-3; high magnification of a1, positive reaction in the degenerating muscle bundle (arrow) (X400)
- b1. MMP-3; positive reaction in the degenerating muscle bundles (X200)
- b2. MMP-3; positive reaction in the degenerating muscle bundles (arrows) (X400)
- b3. MMP-3; high magnification of b1, positive reaction in the degenerating muscle bundles (arrows) (X400)
- c1. HSP-70; (X100)

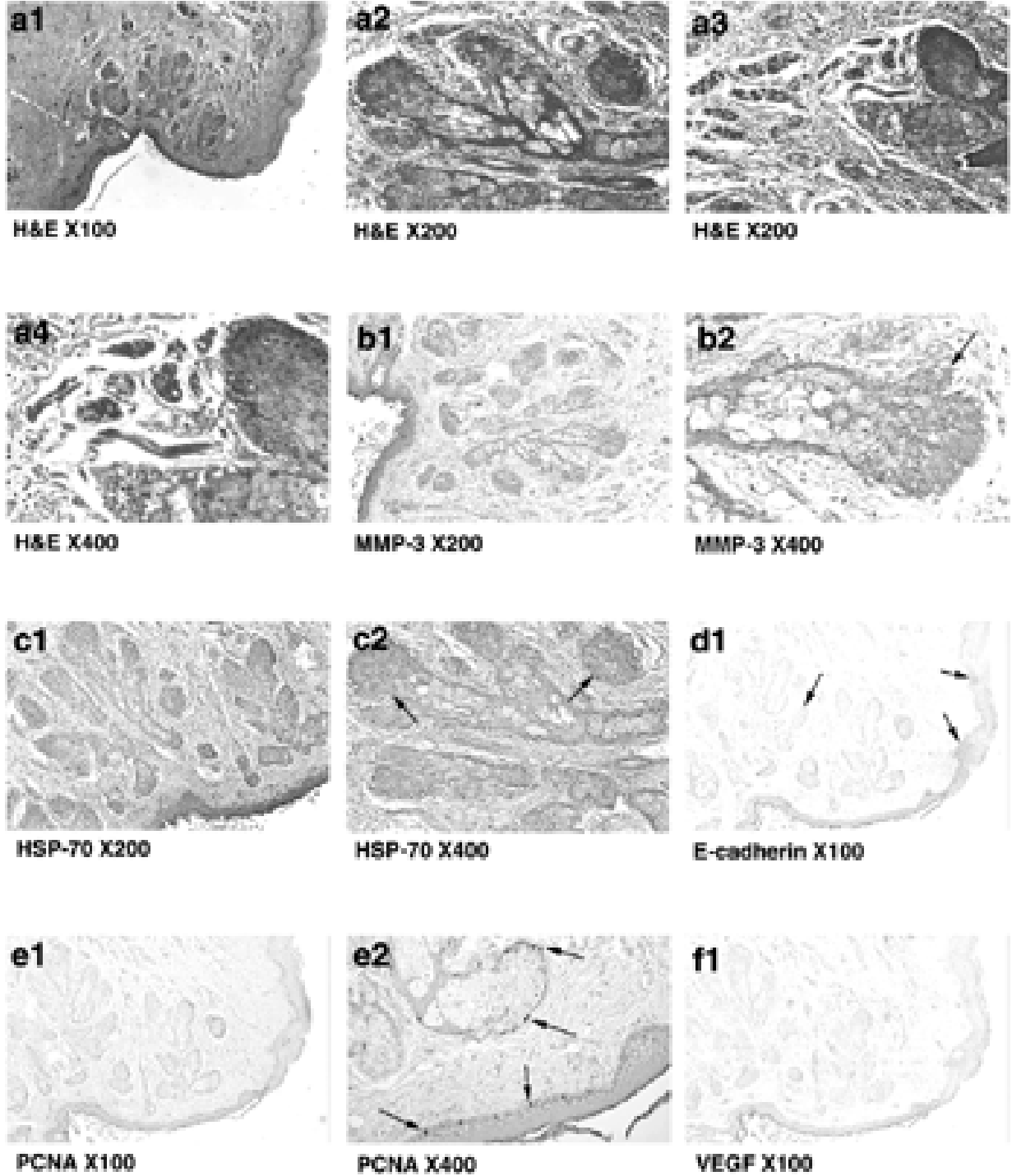
사진부도 ①

Fig. 1



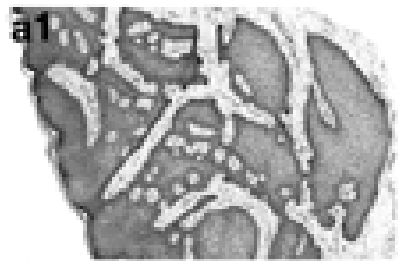
사진부도 ②

Fig. 2

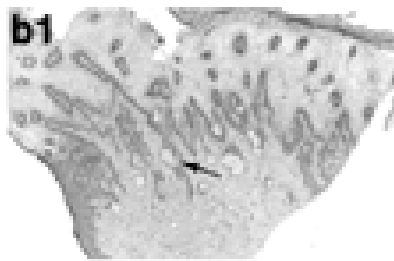


사진부도 ③

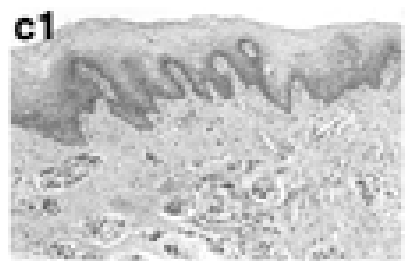
Fig. 3



H&E X100



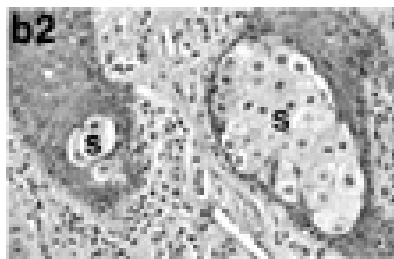
H&E X100



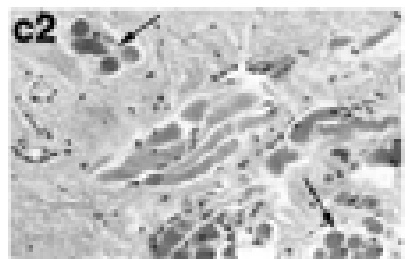
H&E X100



H&E X200



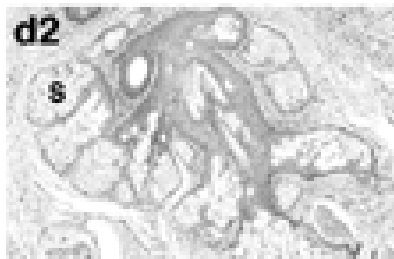
H&E X400



H&E X400



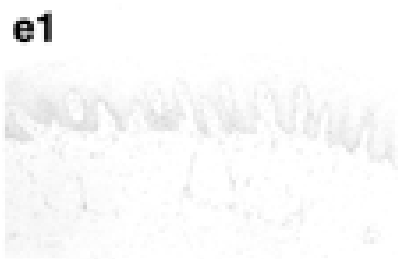
H&E X100



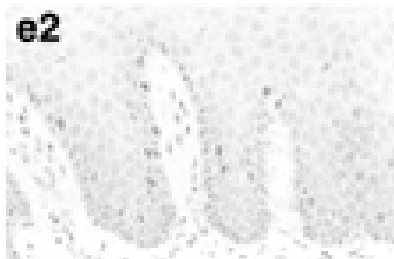
H&E X200



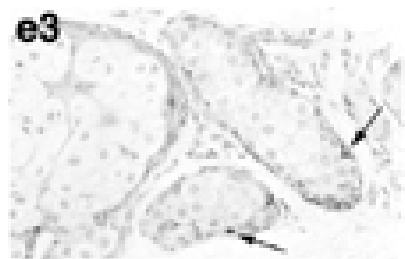
H&E X400



PCNA X100



PCNA X400



PCNA X400

사진부도 ④

Fig. 4

