

## 인간 무세포성 진피기질 위에 배양한 가토 구강각화상피세포의 중층화와 기저막 형성에 관한 연구

김용덕<sup>1</sup> · 안강민<sup>1</sup> · 염학렬<sup>1</sup> · 정현종<sup>2</sup> · 김성민<sup>3</sup> · 장정원<sup>4</sup> · 성미애<sup>1</sup> · 박희정<sup>1</sup> · 황순정<sup>1</sup> · 이종호<sup>1</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, <sup>2</sup>건국대학교 의과대학 소아과,  
<sup>3</sup>강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, <sup>4</sup>연세대학교 의과대학 약리학교실

### Abstract

#### FORMATION OF BASEMENT MEMBRANE AND STRATIFICATION OF RABBIT ORAL KERATINOCYTES CULTURED ON HUMAN ACELLULAR DERMAL MATRIX

Yong-Deok Kim<sup>1</sup>, Kang-Min Ahn<sup>1</sup>, Hak-Yeol Yum<sup>1</sup>, Hun-Jong Chung<sup>2</sup>, Soung-Min Kim<sup>3</sup>, Mi-Ae Sung<sup>1</sup>,  
Hee-Jung Park<sup>1</sup>, Soon-Jung Hwang<sup>1</sup>, Jong-Ho Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Chung-Ju Medical Hospital, Kon-Kuk University

<sup>3</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kang-Nung National University

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, Yonsei School of Medicine

To assess the clinical applicability of bio-artificial mucosa which was made with autologous oral keratinocytes and human acellular dermal matrix, the formation of basement membrane and stratification of oral keratinocytes were evaluated.

Six New Zealand white rabbits (around 2kg in weight) were anesthetized and its buccal mucosa was harvested (1.0 × 0.5cm size). Oral keratinocytes were extracted and cultured primarily with the feeder layer of pretreated NIH J2 3T3 fibroblast. These confluent cells were inoculated on the human acellular dermal matrix and cultured in multiple layer by air-raftering method. After 3, 5, 7, 10, 14 days of culture, each cultured bio-artificial mucosa was investigated the number of epithelial layer of by H&E stain and toluidine blue stain. The immunohistochemical methods were used to evaluate the cell division capacity, the formation of basement membrane, and its property of specific cells (PCNA, cytokeratin 14, laminin). Transmission electromicroscopy was used for the attachment between cells and matrix with the number of hemidesmosome.

In result, the numbers of layer of stratified growth of oral keratinocyte cultured on the human acellular dermal matrix and the number of hemidesomal attachment between epithelial cells and human acellular dermal matrix were similar to the layers of normal oral mucosa after 10 days of culture. The cell division rate, basement membrane formation and proliferation rate increased as culture period increased.

With these results, bio-artificial mucosa with autologous oral epithelial cells cultured on the acellular dermal matrix had clinically adaptable properties after 10 days' culture and this new bio-artificial mucosa model with relatively short culture time can be expected clinical applicability.

**Key words** : Oral keratinocyte, Basement membrane, Hemidesmosome, Bio-artificial mucosa. Human acellular dermal matrix

\* 본 연구는 New Frontier 21 사업의 지원에 의하여 이루어진것임(과제고유번호: M105KO010001-05K1501-00110).

## I. 서 론

구강암을 비롯한 종물 절제나 외상 등의 다양한 원인에 의해 구강 점막조직 결손이 초래될 수 있다. 결손부가 작을 경우 주변의 인접 점막을 이동시켜 재건할 수 있어, 인근 점막과 해부, 조직학적으로 동일한 특성을 보이며 기능적으로 안정된 결과를 얻을 수 있다<sup>1,2)</sup>. 그러나 점막은 그 양이 한정적이고 전위로 인한 구강 운동의 장애를 초래할 수 있다<sup>3,4)</sup>. 또한 피부이식이나 피판을 이용하는 경우, 광범위한 점막 결손을 수복시킬 수 있으나, 재건된 부위가 구강점막과는 조직 형태학적으로 다른 양상을 보이며 이식이 성공한 이후에도 표피탈락, 모발성장, 발한, 건조증, 피부감각반응 등의 문제점이 발생할 수 있다<sup>4,6)</sup>.

따라서 이러한 점막과 피부 이식의 장단점을 보완할 수 있는 인공구강점막의 개발 필요성이 대두되었으며, Rheinwald와 Green<sup>7)</sup>이 feeder layer를 이용한 효율적인 체외 피부각화상피세포의 배양법을 발표한 후 피부 및 점막 결손부에 대한 배양 상피층의 이식이 활발하게 연구되었다.

초기에는 증충배양한 각화상피세포층을 결손부위에 직접 이식하여 재건하려는 시도를 하였으나, 그 물성이 매우 약하고 기저막의 부재로 인한 낮은 생착률을 보였으며, 생착 후에도 수축률이 50%에 이르는 등 실제 임상에 적용하는데 한계점이 노출되었다<sup>8,9)</sup>. 따라서 여러 연구를 통해 진피 구조물의 이식이 재건술의 회복과 이식체의 생착률을 증가시키고 이식부위의 수축을 감소시키며 기저막 형성을 촉진시키는 등, 진피층이 상피층의 피부 재생기전에 중요한 역할을 함이 확인되었다<sup>10-13)</sup>. 이러한 이유로 Bell 등<sup>14)</sup>과 Hull 등<sup>15)</sup>은 젤 형태의 콜라겐 격자구조 상에 인체세포를 사용한 진피조직을 구성하여 실제 구조와 같이 실험실에서 배양하였고, Burke 등<sup>16)</sup>은 콜라겐으로 제작한 진피와 상피, 두층으로 재구성한 인공피부를 이용해서 화상을 입은 환자에게 이식한 결과 피부대체조직으로 좋은 성과를 거두었다. 한편 Langdon 등<sup>17)</sup>과 Lauer와 Schimming<sup>18)</sup>은 거즈 위에, 그리고 Ueda 등<sup>19)</sup>은 type I 콜라겐에 섬유모세포를 배양한 진피층 위에 구강점막세포를, Miki 등<sup>20)</sup>은 polyglycolic acid mesh 상에 식도의 상피를 배양시켜 이식 실험에 성공하였고, Nakamura 등<sup>21)</sup>과 박<sup>22)</sup>은 인체 양막을 진피대용물로 사용하여 생인공점막 모델 개발을 시도하였다. Cuono 등<sup>23)</sup>은 인간 사체에서 채취한 동종진피기질을 이용해서 자가피부 상피세포를 배양을 보고하였다.

이와 같이 진피층으로 인공물질이나 콜라겐과 섬유모세포를 이용한 유사진피가 인공점막 형성에 많이 적용되었으나, 이러한 진피층은 단지 상피층을 이전하거나 배양 매체의 역할만을 가지고 있으며, 실제 임상에 적용하기에는 진피-상피층의 기계적 부착력이 적은 단점이 있었다. 이러한 문제점의 해결을 위해 상피세포와 진피 대체물 계면에 기저막이

형성되고 초미세 구조상으로 상피세포와 기질간에 충분한 반교소체를 통한 결합이 존재한다면 상피층 및 진피층 결합이 높아지고 기계적 물성이 향상되어, 실험실적으로 만들어진 인공점막을 구강내에 이식하여도 상피가 탈락되지 않고 점막 결손부를 회복시킬 수 있을 것으로 생각되었다.

무세포성 진피기질은 인간 사체의 피부에서 상피층과 진피 내부의 세포를 제거한 것으로 세포의 기질 구조와 기저막 복합체가 보존되어 있으며<sup>24,25)</sup> 독성이나 면역반응을 초래하지 않고 이식체의 배양과 조작이 용이하며 섬유모세포와 미세혈관형성이 원활하게 진행되는 장점을 갖는 것으로 알려져 있다<sup>26-28)</sup>. 외상 및 화상으로 인한 광범위한 피부 혹은 점막의 결손이 발생한 경우, 일반적으로 무세포성 진피기질을 이식하고 생착이 된 다음 자가피부이식을 시행하나<sup>29,30)</sup>, 이러한 방법은 생착의 시간이 오래 걸리고 공여부의 이환이 예상된다. 따라서 조직공학적인 방법을 이용하여 제작한 대량의 상피층과 진피기질을 재조합하여 제작한 생인공점막 모델은, 소량의 상피세포의 채취만으로도 단기간에 배양이 가능하고 공여부의 이환율을 낮출 수 있을 것으로 생각된다. 이에 본 연구자는 인간 무세포성 진피기질을 진피층으로 이용한 생인공점막 모델을 제작하고, 구강상피각화세포의 증식, 기저막에의 정착 및 기저막 형성 등을 평가하여 임상적으로 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 가토 구강점막조직의 채취

체중 2kg 내외의 뉴질랜드 백색가토 6마리를 ketamine hydrochloride (Ketara<sup>®</sup>, Yuhan Corp, 40mg/kg)와 xylazine (Rompun<sup>®</sup>, Bayer Korea Ltd, 10mg/kg)을 4:1로 혼합하여 근주하고 마취하였다. 10% 베타딘 (Potadine, Sam-II Pharm., Korea)으로 구강 내를 세척하고 협점막을 1:100,000 에피네프린이 함유된 2% 리도카인(Lidocaine HCl, Huons, Korea)로 침윤마취한 후 1.0×0.5cm 크기의 구강 협점막을 양측에서 채취하였으며 (Fig. 1-A), 5-0 흡수성봉합사 (Surgisorb<sup>®</sup>, Samyang Co., Korea)로 직접 봉합하였다(Fig. 1-B). 생검 후 채취한 조직은 70% 에탄올에서 소독하고 PBS (10ml, Gibco, USA)로 세척한 후 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)에 보존하여 무균실험대로 운반하였다.

### 2. 점막상피세포의 분리와 일차배양

채취한 점막조직을 수술용 가위를 이용해 상피조직 하방의 지방층과 결합조직층 그리고 근조직 잔사를 제거한 후,

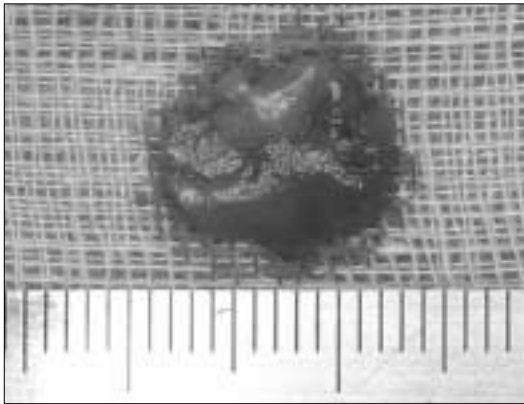


Fig. 1 A. Harvested mucosa.



Fig. 1 B. Donor site was closed directly(Buccal mucosa, Rabbit).



Fig. 2. Acellular dermal matrix (SureDerm®, Hans Biomed LTD, Korea).

dispase II (Boehringer Mannheim, Germany) 1mg/ml 용액에서 4℃에서 16시간 반응시키고 수술용 포셉을 사용하여 상피층과 진피층으로 분리하였다. 상층의 구강상피각 화세포층을 0.05% trypsin-0.02% EDTA (Gibco, USA) 용액에 37℃에서 5분 간 반응시킨 후 FBS (fetal bovine serum, Gibco, USA)가 첨가된 DMEM과 원심분리법으로 trypsin을 제거하였다.

분리된 상피세포의 배양배지는 DMEM과 Ham's F-12 (Ham's F-12 Nutrient mixture, Gibco, USA)가 3:1로 섞인 배지에 10% FBS와 100U/ml penicillin (Gibco, USA), 100µg/ml streptomycin (Gibco, USA), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich Co., USA), 5 µg/ml transferrin (Sigma-Aldrich Co., USA), 10ng/ml epidermal growth factor (EGF, Gibco, USA), 10<sup>-10</sup>M cholera toxin (Sigma-Aldrich Co., USA), 2×10<sup>-10</sup>M triiodothyronine (T-3, Sigma-Aldrich Co., USA), 5 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich Co., USA)을 첨가하였다.

구강점막세포의 효율적인 일차배양을 위해 Rheinwald와

Green 등<sup>7)</sup>의 feeder cell technique을 이용하였다. 스위스 백서 (Swiss albino mouse American Type culute collection No. CCL 92)에서 분리한 NIH J2 3T3 섬유모세포를 5% FBS를 포함한 DMEM에서 융합 상태로 배양하고 mitomycin-C (5µg/ml, Sigma-Aldrich Co., USA)를 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 90분간 처리하였다. 배양된 섬유아세포는 PBS로 3회 세척하여 잔존 mitomycin-C를 세척하였고, 1×10<sup>4</sup>/cm의 농도로 35mm dish의 배양 용기에 부착시켰다. 분리된 구강점막세포를 농도 1×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>로 부착된 feeder cell layer에 접종하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 접종 4일째 배양배지를 교체해서 부착되지 않은 구강점막 상피세포를 제거하였고, 이를 간격으로 배지를 교환하였다.

### 3. 인간 무세포성 진피기질 상에서 구강점막세포의 배양

상용화된 인간 무세포성 진피기질 (SureDerm®, Han's Biomed Ltd, Korea)을(Fig. 2) 무균상태에서 소독된 수술용 가위로 1.0×1.0cm으로 자른 후, 다공성의 면을 하방으로 위치시키고 PBS로 적신 후 기질 상방에 점막 상피세포를 1×10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup>의 농도로 접종하였다. 각 날짜 별로 8개씩, 총 40개의 진피기질에 접종하였으며 배양 배지와 배양 환경은 일차배양과 동일하였다. 세포접종 48시간 동안 액침배양 하였으며 그 후 SureDerm®의 배양면을 공기에 노출시켜 중층분화를 유도하였고, 배양배지는 이틀마다 교체하였다. 배양 3일, 5일, 7일, 10일, 14일 후에 생인공점막 모델을 관찰하였다.

### 4. 조직학적 검사

(1) 면역조직화학적 염색과 관찰

기질 상에서 재구성된 생인공점막 모델을 10% parafo-

maldehyde 용액에서 고정 paraffin block에 포매하였다. 제작된 시편을 각기 4 $\mu$ m 두께의 절편으로 박절하고 슬라이드에 부착시켜 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 한 후 광학현미경으로 구강각화상피세포의 증식을 관찰하였다. 배양 기간별로 무작위로 추출한 4개의 열에서 세포층의 수를 비교하여 증충 증식 양상을 평가하였다.

또한 기저층의 세포분열능과 라미닌의 침착 여부, 구강 점막세포의 특성 유지 여부 등의 확인하기 위해 avidin-biotin-peroxidase complex (Dako LSAB kit, DAKO, USA)를 이용한 면역조직화학염색법을 시행하였다.

즉 4 $\mu$ m 두께의 파라핀 시편을 자르고 유리 슬라이드에 위치시킨 후 plastic holder에 장착하고 xylene에 처리하여 탈파라핀 후 grade ethanol로 재수화 하였으며, 이때 0.01 mol/L의 citrate buffer (pH 6.0)을 첨가하여 항원결정기 손실을 방지하였다. 10분간 메탄올에 3% 과산화수소 혼합 용액을 처리하여 endogenous peroxidase와 alkaline phosphatase를 억제하였으며, 10% normal goat serum (Zymed Laboratories, USA)으로 immunoglobulin의 비특이적 부착을 방지하였다.

일차항원으로는 증식세포핵항원 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA, DAKO, USA), 라미닌 (laminin IMM7-7, Sigma, USA), 사이토케라틴 14 (CK14, Mouse monoclonal, American Res Products Inc., USA)을 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 철야 배양하였다. 10 mmol/L의 Tris-buffered saline으로 세척한 후 이차항원 배양으로 biotinylated goat antimouse IgG에 처리한 다음 HRP-Streptavidin에서 30분간 배양하였으며 사용된 항원으로는 배양 후 hematoxylin으로 역염색 시행 후 관찰하였다.

PCNA는 전체 세포중 PCNA 양성을 보이는 세포들의 비율을 계산한 PCNA labeling index를 사용하여 각기 다른 부위 네군데를 평균으로 하였고, 51%~100%의 양성세포를 '+ + +', 26%~50%의 양성세포를 '+ +', 6%~25%의 양성세포를 '+', 5% 미만을 '-'로 평가하였다. 그리고 CK 14와 라미닌은 발현 유무 만을 조사하였다.

한편 대조군으로 가토의 협점막을 채취하여 같은 방법으로 비교 관찰하였으며, 배양하지 않은 무세포성 진피기질에서 라미닌 존재 여부를 확인하였다.

## (2) 투과전자현미경 관찰

재구성된 동일한 생인공점막을 2.5% glutaraldehyde/0.1M PBS에 고정하고 PBS로 3회 세척한 다음 다시 2% aqueous osmium tetroxide에서 2시간 동안 재고정하였다. 고정된 조직은 PBS로 3회 세척한 후 에탄올로 탈수하고, epoxy resin으로 포매시킨 다음, 두께 1 $\mu$ m로 잘라 슬라이드에 예치시키고 toluidin blue로 관찰하여 상피세포와 무세포성 진피기질의 접촉 부위를 선택한 후, 투과전자현미

경(JEOL 840 $^{\circ}$ , Japan)으로 관찰하였다. 생인공점막의 배양기간에 따라 기질과 상피세포 간의 접촉부위에서 단위 길이당 (1 $\mu$ m) 반교소체의 갯수를 정상 가토 협점막과 비교하였다.

## 5. 통 계

배양 기간에 따른 세포층 수의 변화와 단위 길이당 반교소체의 개수의 비교, 그리고 시기별 PCNA 발현 양성세포의 변화를 Kruskal-Wallis 법으로 시행하였고, Dunn's multiple comparison을 이용해서 검증하였으며, p 값이 0.05 이하면 통계적으로 유의한 변화가 있는 것으로 간주하였다 (GraphPad InStat $^{\circ}$  Ver 3.05, GraphPad Inc., USA).

## III. 결 과

### 1. 광학현미경적 소견

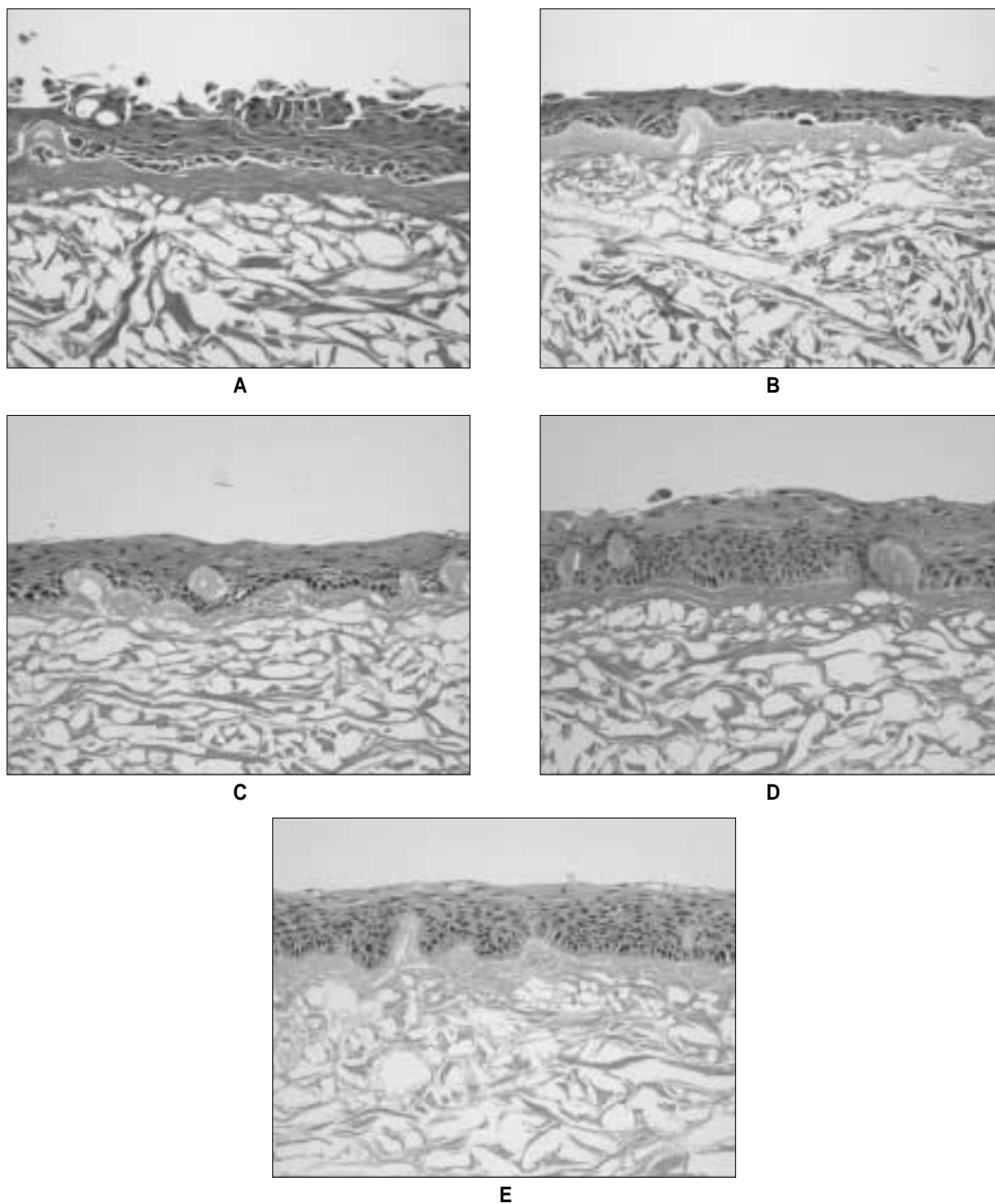
배양 3일째는 구강각화상피세포가 성긴 양상을 보였으나 배양 5일째부터 좀더 치밀한 성장을 보였고, 7일째부터 기저층에 장방형 원주세포가 표피층의 편평상피세포와 명확한 차이를 보였다. 배양 10일째엔 표피층에 일부 각화되는 소견이 관찰되었으며 14일째엔 기저층과 표피층의 형태의 차이가 더욱 명확해졌고, 세포의 성장도 무세포성 진피기질의 불규칙한 표면을 따라 더욱 밀집된 양상을 보였다 (Fig. 3).

배양한 상피세포의 증충분화는 3일째에  $3.53 \pm 1.18$  층이었으나, 5일째엔  $5.70 \pm 1.56$  층으로 증가하였다. 10일째엔  $12.35 \pm 2.46$  층이 그리고 14일째엔  $12.25 \pm 2.22$  층이 관찰되었다. 배양 10일 이후 유의성 있는 증가를 보였으며 (p<0.001), 정상 협점막조직 ( $15.83 \pm 2.74$ )과는 10일과 14일째 모두 유의한 차이가 없는 결과를 보였다 (p>0.05) (Fig. 4).

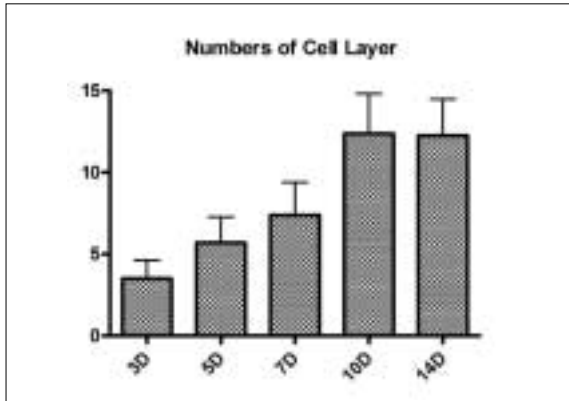
### 2. 면역조직 화학 연구

#### (1) 증식세포핵 항원(PCNA)

배양 3일엔 기저층의 일부 세포에서 PCNA 양성 반응을 보였으며 7일까지 기저층에서 증가하는 양상을 보였다. 배양 10일째엔 근기저층에서도 관찰되었으며, 14일째엔 유극층에서도 발견되었다. 배양 3일째의 PCNA index는  $24.22 \pm 4.33\%$ 였으며 (+ +) 5일째는  $39.33 \pm 2.72\%$  (+ +), 10일째엔  $51.16 \pm 2.80\%$  (+ + +), 14일째엔  $57.82 \pm 8.04\%$  (+ + +)로 증가하는 양상이 관찰되었다. 통계적으로 배양 10일 이후 유의한 증가의 소견을 보였다 (p<0.05).



**Fig. 3.** Cultured epithelial cell layer on acellular dermal matrix.  
A. Epithelial cells grew in multiple layer in scant appearance after 3 days (H&E,  $\times 200$ ).  
B. After 5 days, cells proliferated more densely to each other and to the dermal matrix (H&E,  $\times 200$ ).  
C. Differentiation of basal columnar cells and upper spinous cells can be observed in 7 days (H&E,  $\times 200$ ).  
D. The number of epithelial layer increased, showed matured appearance and some keratinization was found after 10 days (H&E,  $\times 200$ ).  
E. After 14 days, appreciable difference of basal columnar cells and squamous keratinized cells was observed. Ruffled surface of SureDerm<sup>®</sup> provided stronger mechanical strength as rete ridge does in normal mucosa. (H&E,  $\times 200$ ).



**Fig. 4.** The change of epithelial cell layers cultured on acellular dermal matrix in different time of culture (3, 5, 7, 10 and 14 days: n=40).

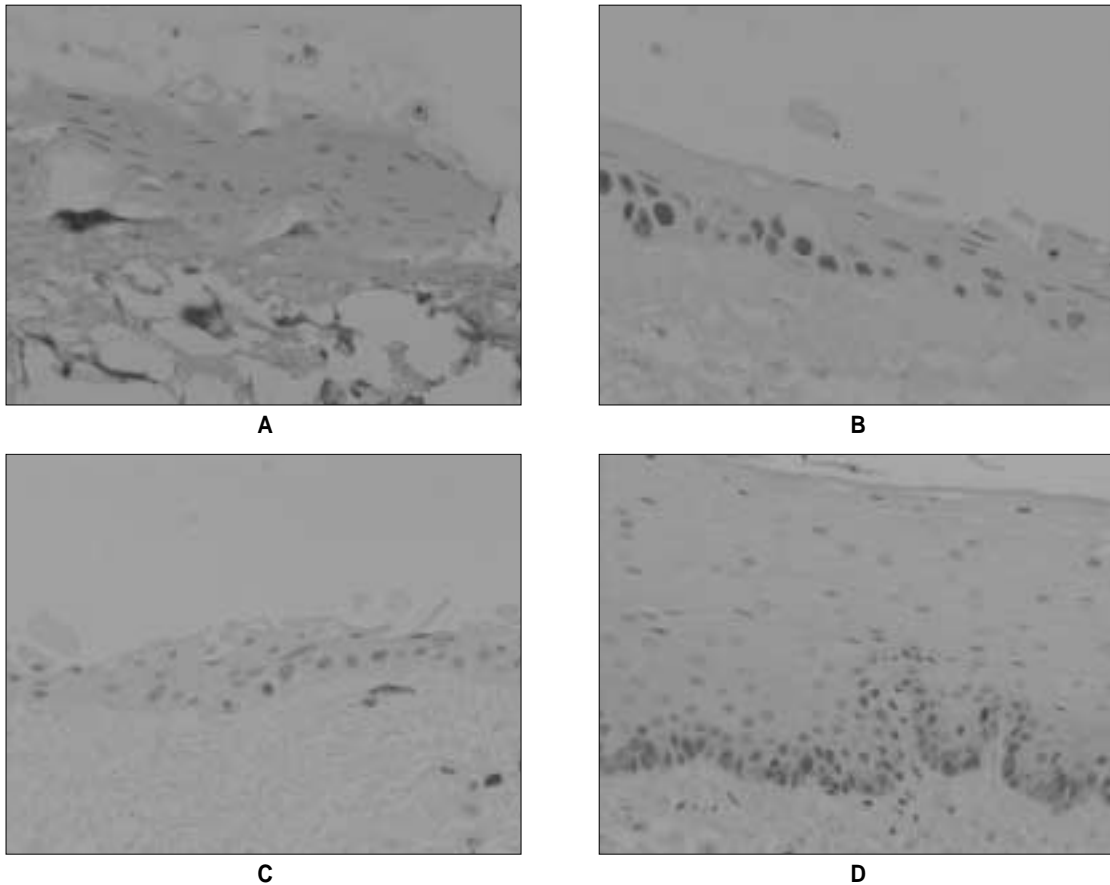
대조군의 정상구강점막조직은  $30.14 \pm 4.51\%$ 였으며, (+ +) 기저층에 주로 발견되었다(Fig. 5, Table 1).

### (2) 라미닌

라미닌은 배양 전 무세포성 진피기질에서 일부 발견되었으며, 배양 3일째부터 기질과 세포 사이에 일부 띠 형태로 관찰되었다. 7일째에는 세포층과 기저막 부근에서 관찰되기 시작했으며, 10일 이후로는 기저층 세포 내에서 기질을 따라서 높은 양성반응이 관찰되었다(Fig. 6).

### (3) 사이토케라틴 14

CK14 양성부위는 배양 3일째 세포의 일부에서 관찰되었으나 기저층에서는 발견되지 않았다. 7일째부터 급격한 증가를 보였다. 배양 10일째엔 기저층과 근기저층에서도 발견되었으며, 정상구강점막조직에서 기저층에서만 발견된 것과는 다른 양상을 보였다(Fig. 7).



**Fig. 5.** PCNA expression of cultured epithelial layer.

- A. PCNA expression can be seen in focal distribution after 3 days ( $\times 200$ ).
- B. After 7 days, only basal cells expressed PCNA (+) reaction ( $\times 200$ ).
- C. The cells with PCNA (+) expression were distributed widely in basal and para-basal layers after 14 days ( $\times 200$ ).
- D. In normal mucosa, PCNA (+) cells congregated in basal layer ( $\times 200$ ).

**Table 1.** Immunoreactivity of PCNA expression in different period

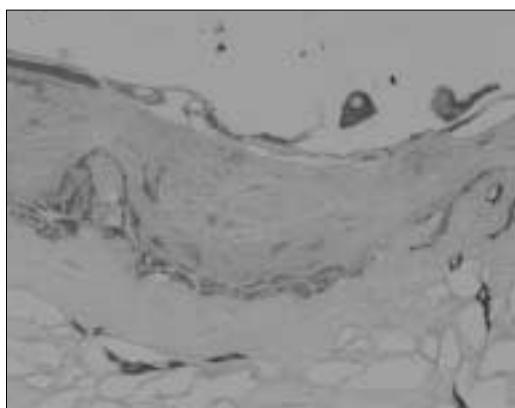
	3D	5D	7D	10D	14D	Normal Mucosa
PCNA Index	24.22±4.33	39.32±2.72	50.70±8.18	51.16±2.80	57.82±8.04	30.14±4.512
Grade	++	++	++	+++	+++	++

(-) negative; (+) low; (++) moderate; (+++) high expression

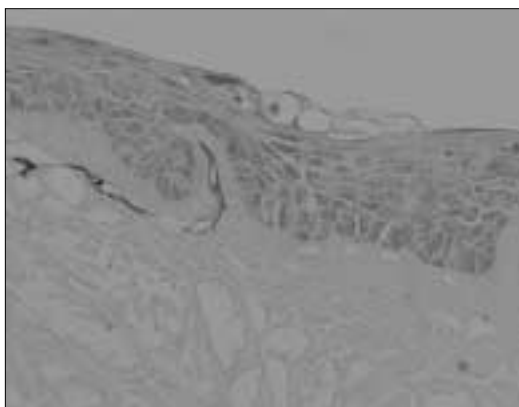
D: days PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antibody



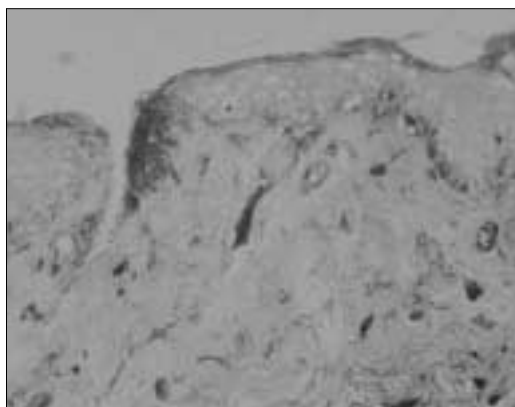
**A**



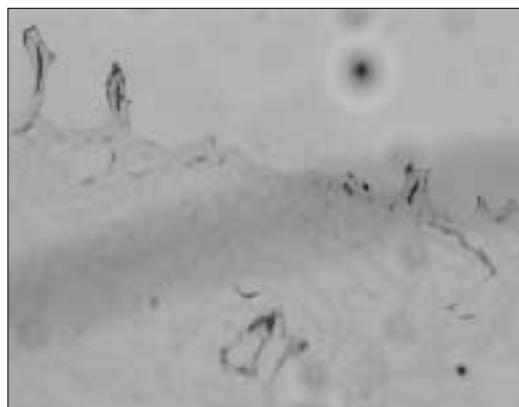
**B**



**C**



**D**



**E**

**Fig. 6.** Immunohistochemical expression of laminin.

A. Laminin (+) area along the surface of acellular dermal matrix can be seen in band after 3 days (×200).

B. After 7 days, laminin (+) area increased along the surface of matrix and in the cytoplasm of basal cells (×200).

C. Laminin (+) area was increased densely in the cytoplasm of basal cells in 14 days (×200).

D. Immunoreactivity within cytoplasm of basal cell layer indicated the basement membrane in the border between epidermal and dermal component of normal gingiva (×200).

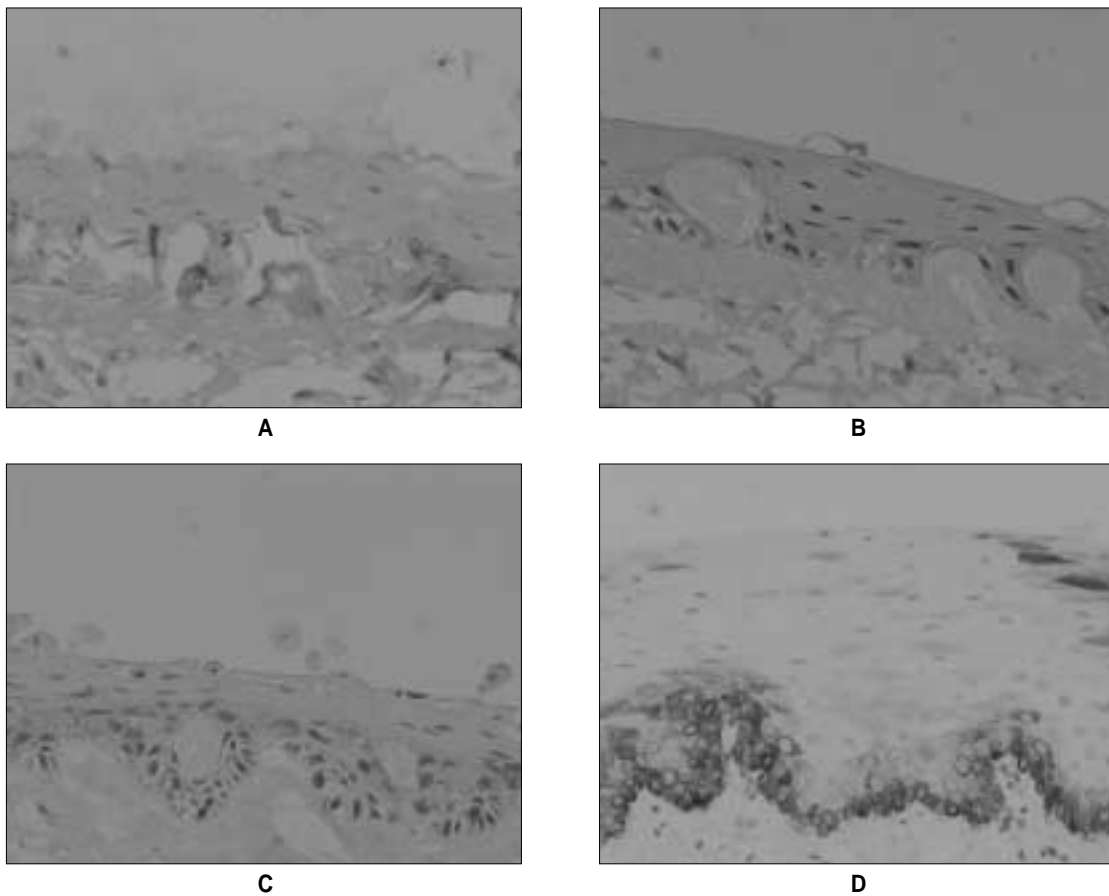
E. Acellular matrix itself expressed the linear positive band along the surface before epithelial cell culture (×100).

### 3. 투과 전자현미경적 소견과 상피세포와 기질 간의 부착

무세포성 진피기질 위에서 세포간의 교소체에 의한 결합은 5일째부터 관찰되기 시작하였으며, 배양시기가 증가할수록 세포의 성장도 더욱 치밀해지는 양상을 보였다. 7일째부터는 세포내 미세사의 증가가 관찰되며 교소체를 통한 세포간의 결합도 증가하였다. 10일 이후로는 세포내 소기관

의 증가가 명확해졌다(Fig. 8).

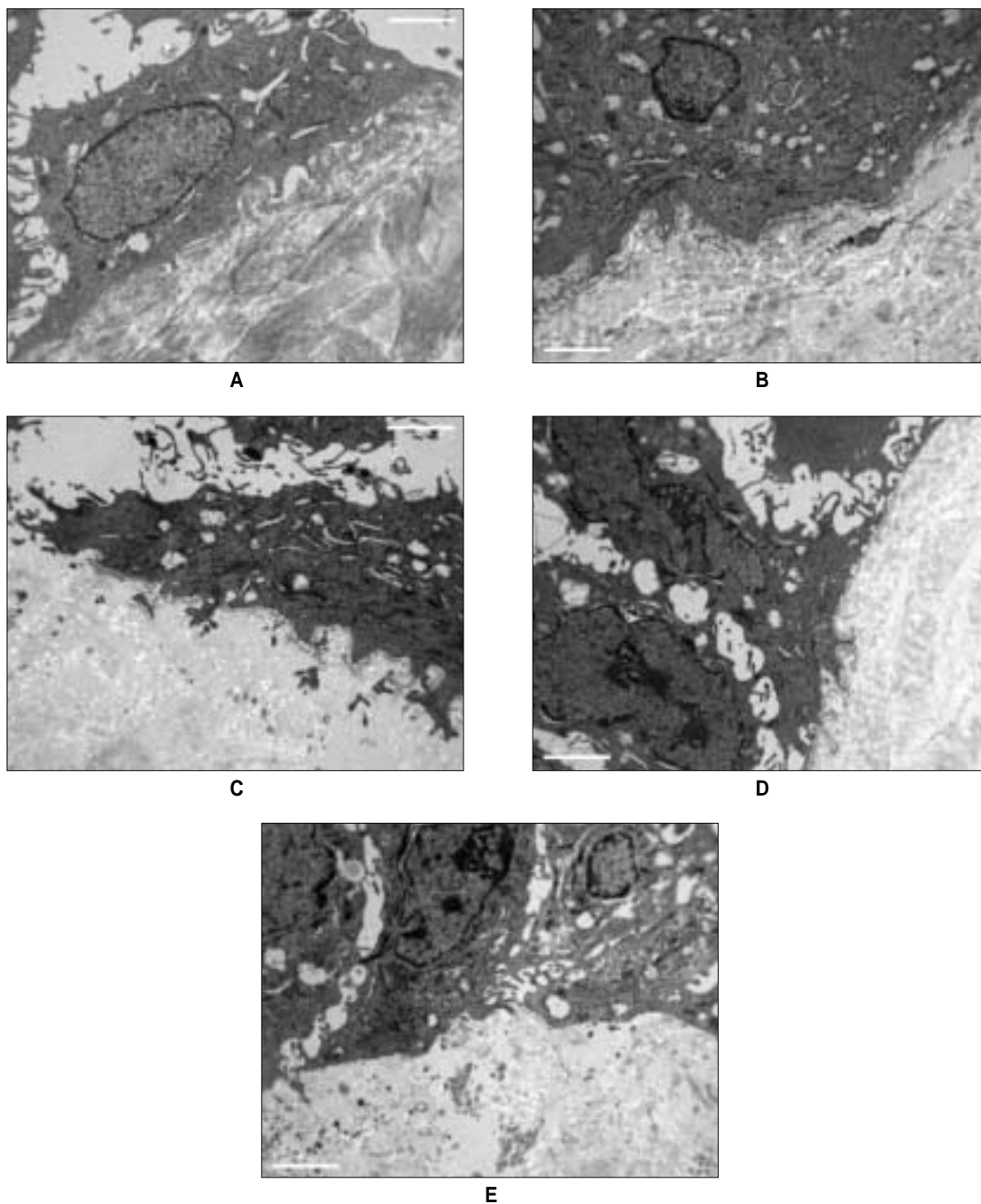
배양한 상피세포와 기질간의 단위길이 당 반교소체의 개수는 3일째엔  $0.32 \pm 0.48$ , 5일째에는  $1.81 \pm 1.52$ 개가 관찰되었으며, 10일째엔  $3.19 \pm 1.17$ , 그리고 14일째엔  $3.13 \pm 1.26$ 개가 관찰되었다. 배양 7일 이후 유의성 있는 증가소견이 관찰되었으며( $p < 0.001$ ), 10일과 14일째는 정상 구강점막조직( $3.38 \pm 1.06$ 개)과 유의한 차이 없이 그 숫자가 비슷하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 9, Table 2).



**Fig. 7.** CK 14 expression of culutured epithelial layer.

- A. Focal distribution of CK 14(+) cells was found in the cytoplasm of upper layer after 3 days ( $\times 200$ ).
- B. CK 14 expression was found in showed in basal cell area after 7 days ( $\times 200$ ).
- C. After 10 days, CK 14(+) expression was widely distributed in basal and parabasal cells ( $\times 200$ ).
- D. CK 14 expression was concentrated in basal layer but some immunoreactivity was found in parabasal layers in normal gingiva ( $\times 200$ ).



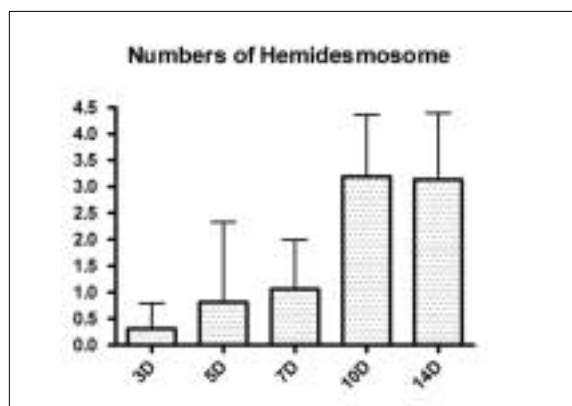


**Fig. 8.** TEM findings showing attachment to acellular dermal matrix.  
A. The attachment of cells to the matrix and cells each other was scarcely found after 3 days ( $\times 10K$ ).  
B. After 5 days, cells attached to the matrix more tightly. some hemidesmosomal attachment were found ( $\times 10K$ ).  
C. Microfilament in the cytoplasm increased after 7 days ( $\times 10K$ )  
D. After 10 days, desmosomal attachment to the cells each other and hemismosomal attachment to the matrix increased ( $\times 10K$ ).  
E. Attachment of microscopical level was increased and matured appearance with dense cytoplasm component was observed after 14 days ( $\times 10K$ ).

**Table 2.** Stratification and basement membrane formation of cultured bio-artificial mucosa in different period

	Number of cell layer	Number of hemidesmosome	PCNA	Laminin	CK14
3D	3.50±1.13	0.32±0.48	++	+	-
5D	5.70±1.56	1.81±1.52	++	+	-
7D	7.38±2.02	1.06±0.93	++	+	+
10D	12.35±2.46	3.19±1.17	+++	+	+
14D	12.25±2.22	3.13±1.26	+++	+	+
Normal Mucosa	15.83±2.75	3.38±1.06	++	+	+

D: days PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antibody CK14: cytokeratin 14



**Fig. 9.** The change of hemidesmosomal attachment to the acellular dermal matrix in different time of culture (3, 5, 7, 10 and 14 days; n=20).

#### Ⅳ. 고 찰

자가 구강점막 배양을 통한 생인공점막의 재구성은 빠르고 손쉬운 제작과정, 구강점막 조직과 유사한 물성, 우수한 생체적합성을 보여야 한다. 이러한 이식을 위해서는 환자의 구강 내에서 정상 점막조직의 채취, 체외에서의 생인공점막 합성, 제작된 인공점막의 이식의 세가지 단계의 기술을 거쳐야 하므로 단기간에 많은 양의 구강상피세포를 얻기 위해 조직공학적인 방법을 이용하여 대량의 일차배양이 시행되어야 한다. 신속한 구강점막세포의 배양을 위해 Rheinwald와 Green<sup>7)</sup>은 feeder layer를 이용한 구강각화세포의 배양법을 발표하였다. 즉 방사선으로 처리하여 분해능이 정지된 NIH J2 3T3 섬유모세포를 영양 공급층으로 하여 피부각화세포의 대량 배양을 최초로 성공시켰고, Gallico 등<sup>31)</sup>은 이러한 방법을 통해 상피의 면적을 단기간에 확장시켜 3도 화상환자의 피부조직 재건에 적용하여 임상적인 배양 성공을 보고하였다.

이번 연구에서 사용한 NIH J2 3T3 섬유아세포 feeder layer는 Rheinwald와 Green<sup>7)</sup>의 방법에서 방사선을 조사

한 것과는 달리 mitomycin-C에 처리하여 배양하였다<sup>32)</sup>. 일반적으로 방사선에 조사된 feeder layer는 안정적이지만 처리 과정이 번거롭고 비용 등의 효율성이 떨어지므로 간단히 mitomycin-C에 처리를 해서 feeder cell layer의 증식을 억제 하는 방법을 이용하였다. NIH J2 3T3 섬유모세포 위에 접종한 구강각화상피세포는 feeder layer에서 분비하는 성장인자들로 인해 성장과 분화가 유도된다. 구강각화세포는 접종 후 4일 내에 feeder layer에 부착되므로, 배지의 첫 교체는 4일 후에 시행하였으며, 배양 후 10 일이 지나면 구강상피세포는 융합상태를 보였고 NIH J2 3T3 섬유모세포는 괴사되어 사라졌다.

본 연구에서는 혈청이 첨가된 배지를 사용하여 일차배양과 생인공점막 배양을 시행하였다. 임상적용을 위해서는 감염 등의 위험성이 적은 무혈청 배지가 유리하지만, 혈청을 사용하지 않았을 경우 NIH J2 3T3 fibroblast의 배양이 어려우며, 혈청배지에 비해 세대수가 짧고 세포의 노화가 빠르게 진행되고 세포의 증식과 구조의 보존성이 떨어지는 등, 대량생산과 중층배양에 불리한 점이 있다<sup>33)</sup>. 그러나 일차배양 과정에서 세포분열이 중지된 feeder cell layer는 효율적인 구강각화상피세포의 분열과 성장을 돕고 스스로 괴사를 일으켰으며, 신 등<sup>34)</sup>의 연구에서 실제 배양된 구강상피세포를 전상판화하여 다른 부위로 이식한 후에도 양호한 생착이 관찰되었다.

구강각화상피세포는 세포의 대사가 빠르고 짧은 시간에 배양이 용이한 장점이 있다. 따라서 임상적으로 구강점막조직에서 채취한 자가구강상피세포를 빠른 시간에 중층분화시킨 자가배양 상피세포 대체물(cultured epithelial analogue : CEA)로 피부나 점막의 결손부를 재건하려는 시도가 있었다. 하지만 진피층의 부재는 높은 조직 탈락과 이식부 수축, 낮은 생착률을 보이므로<sup>10-13,35)</sup> 진피 대체물 개발의 필요성이 대두되었다<sup>36)</sup>. 그동안 개발되어 왔던 콜라겐 매트릭스나 polyglycolic acid mesh 등의 진피 대체물들은 우수한 생체적합성을 보이지만, 기저막의 부재로 상피층과 진피층의 결합이 약해, 이식 후 상피층이 손쉽게 박리되었다. 따라서 이번 연구에서 진피대체물로는 기저막의 존재로 우수

한 생착과 기질과의 접착이 예상되는 상용화된 무세포성 진피기질인 SureDerm®을 사용하였다. 무세포성 진피기질의 광범위한 피부 재건에서 임상적인 적용은 주로 배양 구강상피세포의 sheet를 제작하거나 부분층 자가피부 이식편을 미리 생착시킨 무세포성진피기질 위에 이식하는 방법이 사용되어져 왔다<sup>29,30</sup>. 그러나 이러한 방법은 진피기질의 생착과 구강상피세포의 중층화 증식에만 2주 가량이 소요되고<sup>37</sup> 다시 이식 후 진피기질과 상피층의 결합 기간을 필요로 하므로 실제로 임상적으로 적용하기까지는 많은 시간을 요하게 된다. 따라서 이번 연구에서는 체외 환경에서 무세포성 진피기질 상에서 직접 구강상피세포를 배양하여 중층의 상피층을 직접 이식할 수 있어 빠르고 효율적인 임상적 적용이 가능하리라 판단되었다.

본 연구에서는 광학현미경을 통해 상피세포가 분화되는 양상을 평가하였는데, 배양 7일째부터 기저층의 장방형 원주세포가 관찰되었다. 즉 배양 7일 이후 증식된 구강각화상피 세포의 성숙이 이 시기부터 심화되고 있는 것으로 사료되었으며 세포층의 갯수 증가도 10일 이후에 두드러진 양상을 보였다. 배양 14일째엔 기저부위의 경계가 물결모양의 불규칙한 상태에 일치하는 치밀한 구조가 관찰되었으며, 이는 정상점막조직에서 rete ridge 같이 기계적인 결합의 강도를 증가시키는 요인으로 작용될 것으로 생각되었다. Izumi 등<sup>38</sup>은 무세포성 진피기질에 인간 구강각화상피세포를 배양하는 유사한 실험에서 배양 4일째에 대부분의 기저층에서 장방형의 세포가 발견되었으며, 11일째엔 3~6개의 중층화된 편평각화상피세포층이 발견되었다고 보고하였다. 이는 본 연구의 결과와도 유사하였으나, 본 연구에 비해 조기에 장방형의 원주세포로 분화된 이유는 개체 간의 차이와 배양 환경 및 배양액의 차이로 생각되었다.

증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen: PCNA)는 DNA 합성과 수리, 세포 증식에 중요한 역할을 하는 DNA 합성효소의 부인자이며, 세포의 분열능을 확인하는 면역형광화학적 방법으로 사용되어진다<sup>39</sup>. 본 연구에서 PCNA index는 10일째에 51.16±2.80%, 14일째 57.82±8.04%로, 10일이 지나면서 활발한 증식이 이루어졌고 배양시간이 지날수록 증식 세포핵항원의 발현도 증가함을 알 수 있었다. PCNA의 발현은 초기엔 기저층에서 양성 반응을 보이다가 배양 10일째 이후부터 근기저층으로 확산하는 양상을 보였다. 반면 정상 구강점막조직은 기저층에서 한정된 양상을 보였다. 이는 정상구강점막조직이 기저층을 중심으로 활발한 세포증식이 일어나며, 각화층으로 갈수록 성숙된 세포분포를 보이는 반면, 배양 중인 생인공점막에서는 기저층은 물론 근기저층에서도 활발한 증식이 진행되고 있음을 의미한다. Izumi 등<sup>40</sup>의 무세포성 진피기질에 무혈청배지로 구강각화상피세포를 배양한 실험에서도 유사한 결과가 나왔으나, 배양 18일째엔 PCNA 발현을 기

저층에선 (+++), 근기저층에서는 (+)였다고 보고하였다. 이는 생인공점막의 배양기간의 증가에 따라 정상 구강점막과 유사한 물성을 보이는 것으로 추측되었다.

라미닌은 기저막 단백질의 일종으로 피부, 점막과 신경, 혈관 등의 기저막에서 접착 당 단백질에 해당하며, 세포의 이동과 증식과 분화 등에서 중요한 역할을 한다<sup>41</sup>. 배양을 하지 않은 무세포성 진피기질에서는 제작전 진피에서 남아 있던 기저막 성분의 흔적으로 라미닌 일부가 띠 형태로 관찰되었다. 또한 배양기간이 증가하면서 라미닌의 발현도 증가 하였으며, 세포 내부에서 기질면을 따라 띠형태의 진한 양성반응이 관찰되어 생인공점막이 배양됨에 따라 기저막을 구성하는 접착성분이 증가함을 의미하였다.

Schultze-Mosgau 등<sup>42</sup>은 기저막의 성분인 laminin은 배양 1주에 세포층 하방에서 띠형태로 명확하게 관찰되며 조직손상의 치유단계로 손상 후 24시간에 각화세포와 내피세포의 유주를 유도한다고 발표하였다. 본 실험의 결과도 띠 형태의 라미닌이 배양 기간이 경과됨에 따라 증가되었으며, 이로 인해 향후 이식을 시행한 후에도 우수한 생착과 혈관형성을 예상할 수 있었다.

정상점막조직에서 사이토케라틴은 상피세포의 구조형성과 방어기전에 있어서 중요한 역할을 하며, 조직의 위치와 분화 단계에 따라 각기 다른 유형이 발현된다<sup>43</sup>. 사이토케라틴 14 (CK14)는 호흡기와 소화기 점막조직에 특히 많이 발견되며 주로 기저층에서 발견되며, 일부 근기저층에서도 확인된다<sup>44</sup>. 또한 신생물과 같이 활발한 증식에서는 기저층에서 각 화층까지 균일한 분포를 보인다<sup>45</sup>. 본 실험에서는 7일 이후 기저층에서 발현한 CK14가 10일 이후로 근기저층까지 고르게 발견되었으며, 10일 이후로 활발한 증식을 보임을 관찰하였다.

전자현미경 상에서 세포간의 교소체에 의한 결합과 기질과 반교소체에 의한 결합은 배양 5일째부터 발견되었다. 배양 기간이 경과됨에 따라 세포의 성숙도도 증가하여 7일째부터는 세포내 미세사의 증식이 뚜렷하게 관찰되었다. 이는 미세사의 성분에 해당하는 CK14의 발현도 증가와 비슷한 양상을 보인다. 반교소체는 전자현미경상에서 작은 판모양(basal electron-dense plaque)으로 관찰되며 케라틴 성분의 중간세사와 밀접한 관련을 갖는다<sup>46</sup>. 이러한 반교소체는 구강 내 이식 후에도 전단강도(shear strength)를 견디는데 중요한 역할을 한다. 따라서 광학현미경에서 관찰 가능한 rete ridge와 유사한 물결 구조와 더불어 생인공점막의 기계적 결합에 기여를 할 것으로 생각되었다.

## V. 결 론

1. 인간 무세포성 진피기질 상에 구강상피세포를 배양한 생인공점막의 상피층 증식은 10일째엔 12.35±2.46층,

14일째엔  $12.25 \pm 2.22$ 층으로 관찰되었으며, 정상 구강 점막 조직과 유사한 성장과 분화를 보였다.

2. 배양된 구강각화상피세포는 배양기간이 증가할수록 세포분열능이 증가하고 기저막의 형성과 상피세포의 분화가 증가하는 양상을 보였다.
3. 인간 무세포성 진피기질과 구강각화상피세포 간의 반교소체에 의한 결합은 배양 10일째  $3.19 \pm 1.17$ 개로 정상 점막조직( $3.38 \pm 1.06$ )와 유사한 수치가 관찰되었다.
4. 이상의 결과에서 인간 무세포성 진피기질 상에서 제조한 생인공점막 모델은 배양 10일 이후부터 임상적으로 적용하기에 적합한 기저막 형성과 특성을 보였으며, 단기간 제작과 양호한 생착이 예상되어 향후 임상재건술에서 효율적인 사용이 가능하리라 판단되었다.

### 참고문헌

1. McGregor IA, Morgan G : Axial and random pattern flaps. *Br J Plast Surg* 26 : 202, 1973.
2. Shepherd NS, Maloney PL, Doku HC : Fenestrated palatal mucosal grafts for vestibuloplasty. *J Oral Surg* 33 : 34, 1975.
3. Sharzer LA, Horton CE, Adamson JE et al : Intraoral reconstruction in head and neck cancer surgery. *Clin Plast Surg* 3 : 495, 1976.
4. Wells MD, Edwards AL, Luce EA : Intraoral reconstructive techniques. *Clin Plast Surg* 22 : 91, 1995.
5. Brown JS : T2 tongue : Reconstruction of surgical defect. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37 : 194, 1999.
6. Nehrer-Tairyh GV, Millesi W, Schuried O et al : A comparison of the donor-site morbidity after using the prelaminated fasciomucosal flap and the fasciocutaneous radial forearm flap for intraoral reconstruction. *Br J Plast Surg* 55 : 198, 2002.
7. Rheinwald JG, Green H : Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 331, 1975.
8. Carsin P, Ainaud H, Le Bever J et al : Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. *Burns* 26 : 379, 2000.
9. Clugston PA, Snelling CF, Macdonald IB et al : Cultured epithelial autografts: three years of clinical experience with eighteen patients. *J Burn Care Rehabil* 12 : 533, 1991.
10. Parenteau NL, Nolte CM, Bilbo P et al : Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications. *J Cell Biochem* 45 : 245, 1991.
11. Kangesu T, Navsaria HA, Manek S et al : Kerato-dermal grafts: the importance of dermis for the in vivo growth of cultured keratinocytes. *Br J Plast Surg* 46 : 401, 1993.
12. Compton CC, Hickerson W, Nadire K et al : Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. *J Burn Care Rehabil* 14 : 653, 1993.
13. Gallico GG, O'Connor NE : Engineering a skin replacement. *Tissue Eng* 1 : 231, 1995.
- 14) Bell E, Ehrlich HP, Buttle KF : Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 211 : 1052, 1981.
15. Hull BE, Sher SE, Rosen S et al : Structural integration of skin equivalents grafted to Lewis and Sprague-Dawley rat. *J Invest Dermatol* 81 : 429, 1983.
16. Burke JF, Yannas IV, Quinby WC et al : Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* 194 : 413, 1981.
17. Langdon J, Williams PM, Navsaria H et al : Autologous keratinocyte grafting. A new technique for intra-oral reconstruction. *Br Dental J* 171 : 87, 1991.
18. 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* 59 : 169, 2001.
19. Ueda M, Ebata K, Kaneda T : In vitro fabrication of bioartificial mucosa for reconstruction of oral mucosa: basic research and clinical application. *Ann Plast Surg* 27 : 540, 1991.
20. Miki H, Ando N, Ozawa S, Sato M et al : An artificial esophagus constructed of cultured human esophageal epithelial cells, fibroblasts, polyglycolic acid mesh, and collagen. *ASAIO J* 45 : 502, 1999.
21. Nakamura T, Endo K, Cooper LJ et al : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 106, 2003.
22. Park HJ : Development of bioartificial oral buccal mucosa model using human amniotic membrane, collagen sponge and cultured oral mucosa epithelial cells. *Dongguk University (thesis: master's degree)* 2003.
23. Cuono DB, Langdon R, Birchall N et al : Composite autologous-allogeneic skin replacement : development and clinical application. *Plast Reconstr Surg* 80 : 626, 1987.
24. Izumi K, Feinberg SE : Skin and oral mucosal substitutes: in MJ, Kellehr JC (eds): *Oral and Maxillofacial Clinics of North America*, Philadelphia, Saunders 4 : 61, 2002.
25. Wainwright DJ : Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Bum* 21 : 243, 1995.
26. Rennekampff HO, Hansbrough JF, Woods V Jr et al : Integrin and matrix molecule expression in cultured skin replacements. *J Burn Care Rehabil* 17 : 213, 1996.
27. Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, et al : Transplanted acellular allograft dermal matrix. *Transplantation* 60 : 1, 1995.
28. Medalie DA, Tompkins RG, Morgan JR : Evaluation of acellular human dermis as a dermal analog in a composite skin graft. *ASAIO J* 42 : 455, 1996.
29. Tark KC, Chung S, Shin KS et al : Skin flap prepreparation using acellular dermal matrix and cultured keratinocytes in a porcine model. *Ann Plast Surg* 44 : 392, 2000.
30. Wilke B, Bandemir B : Methodologic aspects in cultivating human keratinocytes. *Dermatol Monatsschr* 175 : 635, 1989.
31. Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC et al : Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311 : 448, 1984.
32. Ponchio L, Duma L, Oliviero B et al : Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays. *Cytotherapy* 2 : 281, 2000.
33. Johnson MC, Meyer AA, deSerres S et al : Persistence of fetal bovine serum proteins in human keratinocytes. *J Burn Care Rehabil* 11 : 504, 1990.

34. Shin YM, Chung HJ, Ahn KM et al : Fabrication of myomucosal flap using cultured oral epithelium in rabbit model. *J Korean Maxillofac Plast Reconstr Surg* 27 : 259, 2005.
35. Williamson JS, Snelling CF, Clugston P et al : Cultured epithelial autograft: five years of clinical experience with twenty-eight patients. *J Trauma* 39 : 309, 1995.
36. Myers S, Navsaria H, Sanders R et al : Transplantation of keratinocytes in the treatment of wounds. *Am J Surg* 170 : 75, 1995.
37. Srivastava A, DeSagun EZ, Jennings LJ et al : Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats. *Ann Surg* 233 : 400, 2001.
38. Izumi K, Takacs G, Terashi H et al : Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. *J Oral Maxillofac Surg* 57 : 571, 1999.
39. Lee JJ, Kuo MY, Cheng SJ, Chiang CP et al : Higher expressions of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99 : 471, 2005.
40. Izumi K, Terashi H, Marcelo CL et al : Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res* 79 : 798, 2000.
41. Timpl R, Brown JC : the laminins. *Matrix Biol* 14 : 275, 1994.
42. Schultze-Mosgau S, Lee BK, Ries J et al : In vitro cultured autologous pre-confluent oral keratinocytes for experimental prefabrication of oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 : 476, 2004.
43. Banks SS, Harris CC : Aberrant expression of keratin proteins and cross-linked envelopes in human esophageal carcinomas. *Cancer Res* 44 : 1153, 1984.
44. Lauer G, Wiedmann-Al-Ahmad M, Otten JE et al : Immunohisto-chemical study during healing of free palatal mucosa grafts on plastic embedded samples. *J Oral Pathol Med* 30 : 104, 2001.
45. Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A et al : Distribution of p63, cytokeratin 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch* 443 : 122, 2003.
46. Izumi K, Song J, Feinberg SE : Development of a tissue-engineered human oral mucosa: from the bench to the bed side. *Cells Tissues Organs* 176 : 134, 2004.

**저자 연락처**

우편번호 110-768  
서울특별시 종로구 연건동 28  
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실  
**이종호**

원고 접수일 2005년 4월 27일  
게재 확정일 2005년 8월 25일

**Reprint Requests**

**Jong-Ho Lee**  
Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University  
# 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-768, South Korea  
Tel: 82-2-2072-2630 Fax: 82-2-766-4948  
E-mail: leejongh@plaza.snu.ac.kr

Paper received 27 April 2005  
Paper accepted 25 August 2005