

## Polydioxanone mesh를 이용한 구강점막의 조직 공학적 재건

문선재\*\* · 주소연\*\*\* · 김진\*\*\* · 김학용\*\*\* · 박정극\*\*\*\* · 차인호\*\*

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실\*, 구강병리학교실\*\*, 구강종양연구소\*,  
전북대학교 섬유공학과\*\*\*, 동국대학교 화학공학과\*\*\*\*

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2003;29:249-256)

### TISSUE-ENGINEERED RECONSTITUTION OF ORAL MUCOSA USING POLYDIOXANONE MESH

Seon-Jae Moon\*\*, So-Yeon Joo\*\*\*, Jin Kim\*\*\*, Hak-Yong Kim\*\*\*, Jung-Keug Park\*\*\*\*, In-Ho Cha\*\*

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery\*, Dept. of Oral Pathology\*\*,  
Oral cancer research institute\*, College of Dentistry, Yonsei University,  
Dept. of Textile Engineering, Chonbuk University\*\*\*,  
Dept. of Chemical Engineering, Dongguk University\*\*\*\*

The lack of sufficient oral mucosa available for intra-oral reconstruction has been dealt with by the use of skin or oral mucosa grafts harvested from donor sites but grafts requires more than one surgical procedures and could cause donor site morbidity. Many investigators have attempted to increase available soft tissue by tissue engineered skin or oral mucosa replacements for clinical applications. But, reconstructed mucosa by several methods have low physical properties such as rolling and contraction.

The aims of this study were to develop an in vitro experimental model that maintains an epithelial-mesenchymal interaction by organotypic raft culture, and to characterize biologic properties of three-dimensionally cultured oral mucosa embedded with Polydioxanone mesh by histological and immunohistochemical analysis.

The results were as follows;

1. Oral mucosa reconstructed by three-dimensional organotypic culture revealed similar morphologic characteristics to equivalent normal oral mucosa in the point that they show stratification and differentiation.
2. The expression of cytokeratin 10/13 and involucrin in the cultured tissue showed the same pattern with normal oral mucosa suggesting that organotypic co-culture condition is able to induce cellular differentiation.
3. After insertion of polydioxanone mesh, increased tensile strength were observed.

These results suggest that three-dimensional organotypic co-culture of the oral mucosa cell lines with the dermal equivalent consisting type I collagen and fibroblasts reproduce the morphologic and immunohistochemical characteristics similar to those in vivo condition. And increased physical properties by use of polydioxanone mesh will helpful for clinical applications.

**Key words** : Polydioxanone, Oral mucosa, Three-dimensional culture

## I. 서 론

지금까지 외상이나 외과적 절제술로 인한 구강내 결손부에 대

한 조직이식에는 주로 피부이식(skin graft)이나 구강점막이식을 이용해 왔다. 그러나 이러한 방법들은 한번 이상의 외과적 술식이 필요하며 공여부위의 문제점이 남게 된다. 또한, 피부는 부속기관을 가지며 구강점막과는 다른 각화 형태를 갖는다는 단점이 있어 구강내로의 이식에 어려움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 조직공학적인 연구가 활발히 진행되고 있다.

Rheinwald와 Green이 최초로 인간 각화 상피의 배양에 관한 연구를 보고한 이후로<sup>1)</sup> 세포 배양법에 대한 다양한 연구들이 진행되어 왔다. 세포 배양을 이용한 연구는 세포를 충분히 얻을 수

### 차 인 호

120-752, 서울시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실  
In-Ho Cha  
Dept of OMFS, College of Dentistry, Yonsei University  
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

\* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(02-PJI-PG3-20507-0026)과 산업자원부 신기술실용화기술개발사업(10005958)의 지원에 의해 이루어진 것임.

있고, 같은 실험을 반복할 수 있으며, 살아있는 상태에서의 세포 내 대사 작용을 연구할 수 있을 뿐만 아니라 체내에서 불가능한 여러 가지 조작이 가능하다는 장점이 있다<sup>9</sup>. 그러나 종래의 상피 세포 배양 방법은 배양 세포 주변 결합 조직의 결여에 의해 배양 세포-결합 조직 상호 작용이 없고<sup>3,5</sup>, 기저막의 소실로 인해 세포-결합 조직 간의 상호 작용이 소실됨으로써 생체와 유사한 극성을 가질 수 없으며<sup>6</sup>, 단층 배양시 배지 아래에서 성장함에 따라 생체와 같은 대기 접촉이 소실되어 배양 세포의 분화가 유도되지 않는다<sup>7</sup>.

최근 배양 접시 바닥에 laminin, type IV collagen 등의 세포의 기질을 도포하는 방법이 소개되기도 했으나 상피 세포의 부착과 증식에는 도움이 되지만 분화의 유도나 중층 형성(stratification)은 이루어지지 않았다<sup>8</sup>. 또한, 사체에서 만들어진 진피조직이 이용되기도 하였으나<sup>4</sup>, 이는 재료가 제한되고 일관된 실험 결과를 얻기 어렵다는 점 때문에 최근에는 제1형 교원질을 이용한 연구 모델의 개발이 활발히 이루어지고 있다<sup>10-12</sup>. 이러한 세포배양법을 이용한 조직 공학적 연구는 주로 화상 환자에 대한 피부의 재건을 목적으로 발전되어 왔으나, 구강 점막의 재건에 관한 연구는 미비한 실정이다.

다양한 술식을 통해 3차원적으로 재건된 상피 또는 구강점막의 임상적 적용 시에 조직의 수축이나 물리적 강도의 결여는 시술의 성공률에 영향을 미치는 중요한 인자로, 이러한 단점을 보완하기 위하여 사체로부터 얻은 진피를 이용하거나<sup>13</sup>, 여러 가지 생체 친화성(biocompatible) 골격들의 사용이 연구되고 있다.

본 연구는 제 1형 교원질, 섬유모세포를 이용한 결합 조직으로 구성된 진피 유사체와 대기 접촉을 유지할 수 있는 배양 조건을 제공하는 organotypic co-culture를 이용하여 구강점막 조직의 삼차원적 재생 방법을 확립하고, 여기에 Polydioxanone mesh를 삽입하여 물리적 성질을 강화한 새로운 모델을 제시하여 그 임상적 효용성을 높이고자 하였다. 또한, 분화 및 염색 표지자에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과를 정상 구강점막과 비교 분석함으로써 생체와 유사한 성장 환경을 제공할 수 있는지 검증하고자 하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. Polydioxanone(PDS) non-woven mesh의 제작

PDS mesh는 전북대학교 섬유공학과 김학용 교수가 제작한 것으로 poly(p-dioxanone) chip을 240°C에서 전기 방적(electrospinning)하였다. 평균 pore size는 100~200µm이며 mesh의 두께는 약 1mm이다. 거시적인 구조를 관찰하기 위하여 scanning electron microscopy를 시행하였다.

본 연구에서는 세포배양을 위하여 가스소독을 시행하였으며 세포의 부착을 돕기 위하여 100% 알콜에서 증류수까지 순차적으로 흡수하였다.

### 2. 구강점막 상피의 일차 배양

NIH 3T3 섬유세포를 10% 우태아혈청(FBS)이 포함된 DMEM(GIBCO BRL, U.S.A.)과 F12(GIBCO BRL, U.S.A.) 혼합배지에서 배양하여 80~90% 정도 자라면 0.4mg/ml mitomycin C(Sigma Chemical co., U.S.A.)를 90분간 처리하고, phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 0.125% trypsin/EDTA(GIBCO BRL, U.S.A.) 처리하여 각 배양 접시에 5×10<sup>5</sup>/100 mm의 세포를 분주하여 feeder를 제작하였다.

구강 상피조직은 제3대구치 발거시 염증이 없는 부위를 환자 등의 하에 채득 한 후 PBS로 3회 이상 세척하고, 1~2mm 크기로 잘게 잘라 0.15% collagenase-dispase(Boehringer Mannheim, Germany)로 1시간 처리하였다. 입체 현미경하에서 상피와 결합 조직을 조직검자로 분리한 후 상피는 0.25% trypsin/EDTA 용액에 15분간 처리하여 원심 분리하였다. 상피세포를 모아 feeder layer에 분주하고, 배지는 3일마다 교환해 주며 70~80% 풍성하게 자라면 냉동 보관 또는 계대 배양을 하였다. 배지는 DMEM과 F12를 3:1로 혼합하여 사용하였고, 10% FBS(Hyclon, UT, U.S.A.)와 0.4 µg/ml hydrocortison, 5 µg/ml insulin(Boehringer Mannheim, Germany), 10<sup>-10</sup> M cholera toxin, 5 µg/ml human transferrin(Sigma Chemical Co., U.S.A.), 2×10<sup>-11</sup> M 3'-5-triiodo-L-thyronine, 10 ng/ml epidermal growth factor(hEGF, Sigma Chemical, U.S.A.)가 포함되도록 하였다.

### 3. Organotypic Co-culture

구강 상피조직의 삼차원적 재건을 위해 제 1형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체를 형성하였다. 제 1형 교원질(Nitta Gelatin Co., Japan)과 중화 완충액(2.2g NaHCO<sub>3</sub>, 4.77g HEPES in 0.05 N NaOH 100 ml), 10배 농축 배지를 각각 8:1:1로 혼합한 후 1×10<sup>6</sup>/ml의 3T3 섬유모세포를 첨가하였다. 이들을 아래쪽이 투과막으로 구성된 12 mm millicell(Millipore Co., U.S.A.)에 113 µl 분주하고 37 °C 배양기에서 1시간 중합시켜 하부 결합조직을 형성하였다. 이때, millicell 상방에 전 처리된 PDS mesh를 위치시켜

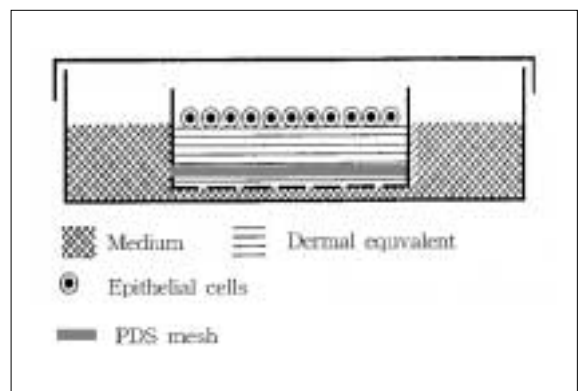


Fig. 1. Schematic drawing of the organotypic co-culture system

진피 유사체에 포함되도록 하였다(Fig. 1). 또한, 제 1형 교원질 양을 226, 113, 90.4, 56.5  $\mu$ 로 조절하여 각각 2, 1, 0.8, 0.5 mm 두께의 조직을 제작한 후 현미경적 소견을 관찰하여 최적의 조직 두께를 결정하기로 하였다.

형성된 하부 결체조직 상부에 일차 배양상피를  $3 \times 10^6$ /well로 분주하고, 일차배양시와 같은 배지를 첨가하여 7일간 배양하여 상피가 결체조직에 부착하도록 하였다. 상피 부착 후 상층배지를 제거하여 상피를 대기에 노출시켰으며, 배양 배지는 2일마다 교환하였다. 총 21일간 배양 후 재건된 상피조직은 하부 결체조직과 함께 광학현미경 및 면역조직화학적 관찰에 사용하였다. 또한 인장 강도 검사를 위해 30 mm millicell을 같은 조건으로 준비하였다.

#### 4. 인장 강도(tensile strength) 검사

30mm millicell에 PDS mesh와 함께 배양된 조직은 상온에서 Texture analyser, TA-XT2(Stable microsystem, UK)를 이용하여 인장 강도검사를 시행하였다. 대조군으로 PDS mesh를 삽입하지 않은 조직이 사용되었다. 2.5×5 mm의 절편을 이용하였고, extension rate는 5 mm/min으로 하였다.

#### 5. 재건된 구강 점막조직의 광학 현미경 관찰

PDS mesh를 이용해 재건된 구강 점막조직은 1, 2, 3주간 배양하여 10% 중성 포르말린에 12시간 이상 고정하고 파라핀에 포매한 후 4  $\mu$ m의 연속 절편을 만들었다. 각 절편은 Hematoxylen-Eosin(H-E) 염색하여 광학 현미경으로 조직학적 구조와 상피 분화를 관찰하였다. 조직학적으로 기저세포층의 책상 배열(palisading)과 극성, 극세포층의 형성 등을 정상 구강점막의 소견과 비교 검토함으로써 삼차원적 배양이 생체 조건과 유사한 배양환경을 제공했는지 관찰하였다.

#### 6. 재건된 구강 점막조직의 면역조직화학 염색

1, 2, 3주간 배양된 조직은 파라핀에 포매 후 4  $\mu$ m의 연속절편을 얻어 xylene에서 3회 처리하여 파라핀을 제거하고 95%, 90%, 70% ethanol에서 순차적으로 흡수하였다. 0.5% hydrogen peroxide에서 endogenous peroxidase를 제거한 후 정상 goat serum으로 30분간 처리하고 일차 항체를 3% BSA(bovin serum albumin)가 포함된 PBS에 희석하여 3시간 동안 반응시켰다. 상피분화 표지자로서 cytokerati(CK) 10/13(Dako, Denmark), involucrin(Santa Cruz, USA), vimentin(Dako, Denmark)을 이용하였다. 일차항체 반응 후 Tris-buffer saline(TBS)에서 3번 세척하고 3% BSA에 희석한 5  $\mu$ g/ml biotinylated anti-mouse/anti-rabbit IgG에 30분간 반응시키고 3회 TBS에서 세척하였다. 3  $\mu$ g/ml horseradish peroxidase streptavidin에서 30분간 방치시키고 DAB와 hydrogen peroxide를 이용하여 발색 한 후 Mayer's hematoxylin에서 대조 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 대조군으로 점막하층이 포함된 정상 점막

조직을 이용하였고 일차 항체를 반응시키지 않고 염색한 조직을 음성 대조군으로 사용하였다.

### III. 결 과

#### 1. 정상 구강점막 상피의 일차배양

3T3 feeder에서 일차배양한 정상 구강점막 상피는 4~5일째 세포가 부착하여 증식을 시작하였고, 1주일째에는 10~20개의 세포로 이루어진 군집(colony)을 형성하였다. 약 10일 후에는 육안으로 뚜렷이 관찰할 수 있는 군집을 형성하였으며, 점차 군집은 주변의 feeder를 밀어내면서 커져 약 14일 후에는 서로 융합하였다. 지름 100 mm의 배양 접시의 경우 세포가 꽉 찼을 때 약  $8 \sim 9 \times 10^6$ 의 상피세포로 구성되어 있었다. 활발히 세포 증식을 하는 일차배양 구강점막 상피는 세포간의 경계가 명확하였고, 핵인이 뚜렷이 관찰되었다.

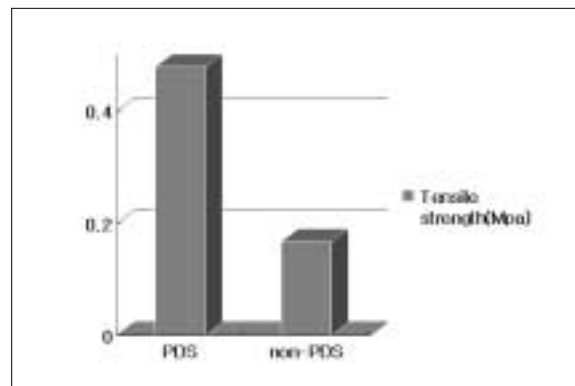
#### 2. 재건된 조직의 조직학적 평가

제 1형 교원질과 섬유세포로 구성된 진피 유사체 상에서 대기 접촉 하에 3주간 배양된 상피는 정상 구강점막 상피와 유사하게 중층상피층이 형성되어, 1~2층의 기저세포층, 5~6층의 극세포층과 각질을 형성하며 탈락하는 부전 각화 층으로 분화되어 있었다. 1주에서는 납작한 핵모양을 갖는 3~4개의 상피 층이 관찰되었고(Fig. 2-a), 2주에서는 기저층 부위에서는 납작하고 위로 갈수록 크고 둥근핵을 보이며 8~9개의 상피 층을 보였으며(Fig. 2-b), 3주에는 2주에 비해 층이 다소 줄어들었고 다소 크고 pore를 갖는 세포들이 관찰되었다(Fig. 2-c). 또한 2, 1, 0.8, 0.5 mm의 두께로 제작된 조직 중 1 mm에서 가장 뚜렷한 중층화가 관찰되었다.

#### 3. 인장 강도 검사

Texture analyser, TA-XT2(Stable microsystem, UK)를 이용한 검사에서 PDS mesh를 삽입한 군은 평균 인장강도가 0.478 MPa이었고, 삽입하지 않은 대조군에서는 0.168 MPa로 나타났다(Table 1).

Table 1. Tensile strength test



**Table 2.** The expression of various markers on normal oral mucosa and reconstituted tissue

	Epidermis		Dermis
	CK 10/13	Involucrin	Vimentin
PDS 1w	+	+	-
PDS 2w	++	++	-
PDS 3w	+++	+	-
Normal OM	++++	++++	++++

+ : Presence  
 - : Absence

PDS : polydioxanone

OM : oral mucosa

CK : cytokeratin

#### 4. 면역조직화학적 평가

##### 4.1. Cytokeratin 10/13

정상 구강점막 상피는 기저 세포층 및 기저상층을 제외한 상부 세포층에서 모두 양성으로 발현되었고(Fig. 3-a) 재건된 조직에서도 마찬가지로 한 층의 기저 세포층과 일부 기저 바로 상층에서 음성반응을 보였고 그 상방 상피 층에서는 모두 cytokeratin 10/13이 발현되었다. 1주간 배양한 조직은 cytokeratin이 약하게 발현되거나 약한 편이고 2주, 3주로 갈수록 분화 층이 넓어지고 cell-cell junction이 명확해지는 경향을 보였다. 상피 하방으로는 삽입한 PDS mesh가 관찰되었고 그 주위에 이물반응은 없었다(Fig. 3-b).

##### 4.2. Involucrin

정상 구강상피에서는 기저 세포층을 제외한 모든 층에서 양성 반응을 나타냈으며(Fig. 4-a), 재건된 조직에서는 기저 세포층에서는 염색되지 않았고 분화가 일어나는 기저 상층에서부터 표층까지는 강양성으로 염색되었다. 또한 분화 층과 미분화 층이 명확히 구분되었다(Fig. 4-b).

##### 4.3. Vimentin

정상 구강상피에서는 세포질 부위에 강하게 염색되었으나(Fig. 5-a), 재건된 조직에서는 1, 2, 3주 모두에서 섬유모세포에만 염색이 되었고 나머지 부분은 염색되지 않았다(Fig. 5-b).

### IV. 고 찰

외상이나 구강종양의 적출에 따른 구강점막의 결손이나 보철 전 치치방법으로 구강전정 성형술의 필요성 등에 의해 다량의 구강점막 이식이 필요한 경우에는 주로 피부이식이나 구강 내 다른 부위의 점막 이식을 이용하여 왔다. 최근에 구강 점막 상피

의 삼차원적 배양과 그 특성에 관한 연구가 진행되었으나<sup>14)</sup>, 임상적 적용 시에 물리적 성질의 결여로 조작이 어렵고 조직의 말립과 수축 등의 문제점이 지적되었다.

물리적 성질을 개선시키기 위해 Paul 등<sup>15)</sup>은 배양된 상피 조직을 부분층 판막 위에 적용하였으나, 이는 이차적인 공여부의 문제점을 남기게 된다. Izumi 등<sup>16)</sup>은 사체로부터 얻은 진피위에 각화 상피세포를 배양하여 물리적 강도를 높이고자 하였으나 실제 이용에 제한이 많다는 단점이 있다. Dirk 등<sup>16)</sup>은 생분해성 골격인 hyaluronan위에 자가 각화 상피를 배양하여 광범위한 연조직 손상을 받은 환자에 적용한 후 만족할 만한 결과를 얻었다고 보고하였다. 그 외에도 제 1형 교원질, nylon mesh, gelatin coating 등의 이용도 보고 되었다<sup>17,19)</sup>. 본 연구에서는 물리적 성질의 개선을 위해 Polydioxanone을 생분해성 골격으로 사용하였다. Polydioxanone은 유연성이 있고 조작이 쉬우며 최소한의 조직반응을 보이는 생분해성 물질로써, 주로 흡수성 봉합사나 plate, screw로 이용되어왔다<sup>20)</sup>. Molar 등<sup>21)</sup>은 세 가지 흡수성 봉합사 물질(Polydioxanone, Poliglecaprone 25, Glycomer 631)의 생체 친화성 및 흡수 기간에 대한 비교 연구에서 Polydioxanone이 흡수율은 다소 낮으나 훌륭한 생체 친화성을 보였다고 보고하였다.

상피의 물리적 특성에 대해 Vidik은 피부의 노화에 관한 in vivo 및 in vitro상의 평가에서 피부의 강도에 관해, Leveque 등은 피부의 점탄성도를 측정하는 방법에 대해 보고하였다. Vogel<sup>22)</sup>은 상피의 두께 측정 이외에도 최대 부하, 인장강도, 최대 신장 및 탄성율의 측정에 대한 연구에서 물리적 성질의 다양한 측정 방법을 제시하였다. 본 연구에서 Polydioxanone mesh를 삽입한 후 재건된 구강점막은 인장강도가 삽입하지 않은 대조군에 비하여 3배정도 증가한 것으로 보아 Polydioxanone mesh도 생분해성 골격 물질로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

상피세포의 배양을 위해서는 생체와 유사한 상태를 재현하는 것이 필수적이다. 지금까지 충분한 양의 상피세포를 얻기 위해 일차 배양법이 많이 이용되었으나, 일차 배양은 상피의 각질 분화가 일어나지 않고 단층으로 성장하여 정상 생체조직과는 많은 차이가 있다. 이것은 종래의 일차 배양법이 상피의 성장과 분화를 조절하는 상피-결체 상호작용이 결여되어 있고, 배지 하방에서 세포를 배양함에 따라 대기와 접촉하는 생체와는 다른 성장 조건이었기 때문이다. 이러한 한계를 극복하기 위해 최근에는 진피 유사체를 이용하여 상피의 삼차원적 재건을 위한 시도가 활발히 이루어지고 있다. Tsunenaga 등은 제 1형 교원질과 섬유모세포로 인공 결체조직을 구성해 주고 피부 상피 세포를 organotypic culture한 결과 in vivo 상태와 유사한 기저 세포층, 극세포층, 각화층의 삼차원적 상피가 얻어졌다고 보고하였다. Rebel 등은 방광 점막을 이용하여 삼차원적 collagen gel culture를 시행한 실험에서 섬유모세포와 collagen gel 사이의 상호작용이 방광 상피의 분화를 유도한 것이라고 주장하였다. Fujiyama 등은 제 1형 교원질과 섬유모세포로 하부 결체조직을 형성한 후 방광 점막 상피를 배양하였을 때, 여러 층의 transitional cell이 자라고 기저 세포층에 극성이 재현되는 것을 확인하였다.

본 실험에서는 최적의 조직두께를 결정하기 위하여 millicell 내

의 제 1형 교원질의 양을 조절하였다. 제작된 2, 1, 0.8, 0.5 mm 두께의 조직 중 1 mm 두께에서 광학 현미경 관찰 시 구강 점막과 가장 유사한 양상을 보였으며 뚜렷한 중층화가 관찰되었다. 이는 하부 조직으로부터의 적절한 영양 공급에 의한 것으로 사료된다.

면역조직화학적 검사에서 일차 항체로 사용된 Cytokeratin 10/13은 53kD, 56.5kD의 cytokeratin과 반응하는 항체로 각화 중층상피와 비각화 중층상피에서 미분화된 기저 세포층을 제외한 분화 층에 발현된다고 알려져 있다. 본 연구에서는 강양성으로 발현하여 재건된 상피세포가 각질세포 기원임을 보여주었다.

Involucrin은 세포질 내에 존재하는 수용성 단백질로 keratin의 전구물질로 여겨지는 단백질이다. 이는 분열과 증식을 하는 기저 세포층에는 존재하지 않고 극세포층과 과립층에서 발현된다. 본 연구에서는 재건된 조직의 상층부에서 발현하여 증식과 분화를 유지하고 있음을 알 수 있었다.

Vimentin은 간엽세포 기원(mesenchymal origin)의 57kD 중간세사(intermediate filament)와 반응하는 항체로 내피세포(endothelial cell), 섬유모세포(fibroblast), 평활근(smooth muscle) 등에서 발현된다고 알려져 있다<sup>29</sup>. 본 연구에서는 정상 조직에 비해 약한 발현 양상을 보였다. 이것은 진피 유사체 제작 시 실제 정상 진피 조직 보다 적은 수의 섬유모세포가 사용되었고, 한 부위의 절편에서 나타나는 섬유모세포가 정상조직에 비해 적었기 때문인 것으로 사료된다.

본 실험에서는 구강 점막 상피세포를 제 1형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체 상에서 배양시에 물리적 성질의 향상을 위하여 Polydioxanone mesh를 삽입한 후, 대기 접촉환경을 제공하는 organotypic co-culture를 이용하여 새로운 구강점막을 조직공학적으로 재건하였다. 재건된 조직은 조직학적 소견상 정상 조직과 유사한 형태학적 특징을 보이며, 면역조직화학적 염색에서 증식과 분화를 유지하고 있는 것으로 보아, 본 실험 모델이 생체와 유사한 환경을 제공한 것으로 사료되었다. 그러나 구강 점막 조직 이식 시 실제적으로 유용한 재료를 개발하기 위해서는 생체조직과 보다 유사한 환경의 재현과 물리적 성질의 개선을 위한 지속적 연구가 요구된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 구강 점막 상피세포를 진피 유사체 상에서 대기 접촉환경을 제공하는 organotypic co-culture를 이용하여 조직공학적으로 배양시에 물리적 성질의 향상을 위하여 Polydioxanone mesh를 삽입한 후 광학 현미경 검사를 통한 형태학적 특성과 면역조직화학적 염색을 통한 생물학적 특성을 정상 구강 점막 상피와 비교 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 조직공학적으로 재건된 구강점막에서도 정상 구강 점막 상피와 유사한 중층화와 분화가 관찰되었으며, 1 mm 두께의 조직에서 가장 뚜렷한 중층화가 관찰되었다.
2. 면역조직화학적 검사 결과 분화표지자인 Involucrin은 상층부에서 발현하여 증식과 분화를 유지하고 있음을 알 수 있었고,

Cytokeratin 10/13은 강양성으로 발현하여 재건된 상피세포가 각질세포 기원임을 보여주었다. 그러나 Vimentin은 발현되지 않았다.

3. Polydioxanone mesh의 삽입 후 인장강도가 3배 정도 증가하였다.

이상의 결과로 Polydioxanone mesh를 이용하여 조직공학적으로 재건된 구강 점막 상피는 생체와 유사한 형태학적 및 생물학적 특징을 나타내며, 물리적 성질이 향상되어 구강내 조직 이식 시 유용한 재료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Rheinwald JG, Green H : Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-343, 1975.
2. Freshney RI : Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York, Wiley-Liss, 1987.
3. Levine JF, Stockdale EF : Cell-cell interactions promote mammary epithelial cell differentiation. *J Cell Biol* 100:1415-1422, 1985.
4. Boyce ST, Hansbrough JF : Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6-sulfate. *Surgery* 103:421-431, 1988.
5. Shahabuddin L, Berthod F, Damour O, Collombel C : Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol* 3:107-114, 1990.
6. Sabatini DD, Griep EB, Rodriguez-Boulan EJ, Dolan WJ, Robins ES, Papadopoulos S, Ivanov IE, Rinder MJ : Biogenesis of epithelial cell polarity. *Mod Cell Biol* 2:419-450, 1983.
7. Oda D, Savard CE, Eng L, Lee SP : The effect of N-methyl-N'-mitrosoguanidine (MNNG) on cultured dog pancreatic duct epithelial cells. *Pancreas* 12:109-116, 1996.
8. Surtherland RM : Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240:177-184, 1988.
9. Toillier J, Dumas H, Tardy M, Tayot JL : Fibroblast behavior on gels of type I, III, and IV human placental collagens. *Exp Cell Res* 191:95-104, 1990.
10. Hoffman RM : Three dimensional histoculture: origins and applications in cancer research. *Cancer Cell* 3:86-92, 1991.
11. Robins KT, Varki NM, Storniolo AM, Hoffman H, Hoffman RM : Drug response of head and neck tumors in native-state histoculture. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117:83-86, 1991.
12. Robins KT, Connors KM, Storniolo AM, Hanchett C, Hoffman RM : Sponge-gel supported histoculture drug response assay for head and neck cancer. Correlations with clinical response to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120:288-292, 1994.
13. 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* 79(3):798-805, 2000.
14. 차인호, 육종인, 손영숙, 이은하, 정소영, 김경주, 김진 : 구강점막 각화 상피의 삼차원적 배양과 재건된 조직의 생물학적 특성. *대한병리학회지* 34: 181-189, 2000.
15. Paul W, Ronald GD, Michael S : The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds. *Burns* 26:609-619, 2000.
16. Dirk AH, Cario S, Stefan F, Joachim W : Extensive traumatic soft tissue loss: Reconstruction in severely injured patients using cultured Hyaluronan-based three dimensional dermal and epidermal autografts. *J Trauma* 50:1125-1136, 2001.
17. Fleischmajer R, MacDonald EDII, Contard P, Perlish JS : Immunohistochemistry of a keratinocyte-fibroblast co-culture model for reconstruction of human skin. *J Histochem Cytochem* 41:1359-1366,

- 1993.
18. Raymund EH, Markus D, Gilbert W, Bjoern S : Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tissue Engineering* 6(1):53-67, 2000.
  19. Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS : Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. *J Biomed Mater Res* 48:631-639, 1999.
  20. Teebken OE, Pichmaier AM, Haverich A : Cell seeded decellularised allogeneic matrix grafts and biodegradable Polydioxanone-prostheses compared with arterial autografts in a porcine model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22:139-145, 2001.
  21. Molea G, Schonauer F, Bifulco G, D' Angelo D : Comparative study on biocompatibility and absorption time of three absorbable monofilament suture materials(Polydioxanone, Poliglecaprone 25, Glycomer 631). *British J Plastic Surg* 53:137-141, 2000.
  22. Vogel HG : Mechanical measurements of skin. *Acta Derm Venereol* 185:39-43, 1994.
  23. Osborn M, Debus E, Weber K : Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur J Cell Biol* 137-43, 1984.

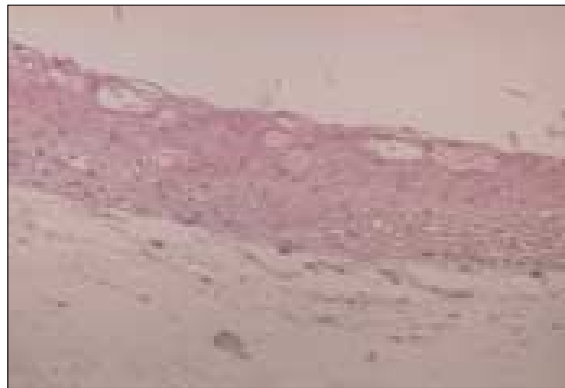
사진부도 ①



**Fig. 2-a.** Histologic findings of raft culture (1 week)  
3~4 layered epithelium shows flattened nuclear shape (H&E, ×40)



**Fig. 2-b.** Histologic findings of raft culture (2 week)  
8~9 layered epithelium shows more round nuclear shape with basal cell polarity and parakeratosis (H&E, ×40)



**Fig. 2-c.** Histologic findings of raft culture (3 week)  
Decreased layered epithelium shows increased cell size and pore with basal cell polarity and parakeratosis (H&E, ×40)



**Fig. 3-a.** Normal oral mucosa  
The cytokeatin 10/13 expression is found in the entire layer except for basal cell and suprabasal cell layers (CK10/13, ×20)



**Fig. 3-b.** Raft culture tissue with PDS mesh  
The cytokeatin 10/13 is distributed showing the same pattern with normal oral mucosa (CK10/13, ×40)

사진부도 ②



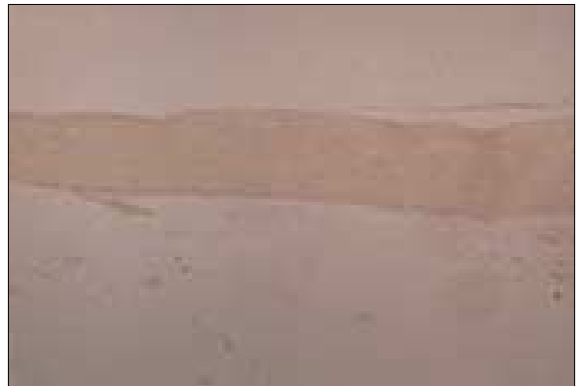
**Fig. 4-a.** Normal oral mucosa  
The involucrin expression is demonstrated in the entire layer except for basal cell layers (Involucrin,  $\times 20$ )



**Fig. 4-b.** Raft culture tissue with PDS mesh  
The involucrin is distributed showing the same pattern with normal oral mucosa (Involucrin,  $\times 40$ )



**Fig. 5-a.** Normal oral mucosa  
The vimentin expression is found in the cytoplasm and fibroblast (Vimentin,  $\times 20$ )



**Fig. 5-b.** Raft culture tissue with PDS mesh  
The vimentin expression is rarely found in fibroblast (Vimentin,  $\times 40$ )