

구강점막 각화상피세포의
피부 재생피화 유도

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 현 실

구강점막 각화상피세포의 피부 재생피화 유도

지도 차 인 호 교수

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2005년 12월 31일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 현 실

김현실의 박사 학위 논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2005년 12월 31일

감사의 글

The great man is he who in the midst of the crowd can perfectly keep the independence of solitude.

익숙한 글귀가 눈에 띄었습니다. 중학교 시절부터 나와 같이 한 낱은 사전 귀퉁이에 적힌 글입니다.

문득 나를 여기까지 끌고 온 그 '외로움'에 대해 생각해 보았습니다.

박사 과정 동안 부족한 저를 지도해 주시고 많은 가르침과 질책으로 이끌어 주신 차 인호 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 바쁘신 중에도 논문에 관심과 조언을 아끼지 않으신 김 진 교수님과 박 광균 교수님, 육 중인 교수님과 김 형준 교수님께 감사를 드립니다. 더불어 항상 나의 좋은 동료였던 김 남희 선생님과, 애정과 이해로 저를 지켜봐 준 구강병리학교실 식구들에게 고마움을 전합니다.

지금까지 저를 키워 주시고 공부에 전념할 수 있도록 후원해 주신 부모님의 은혜에 감사드립니다. 든든한 나의 지지자 친구 영미에게도 고마움을 전합니다.

앞으로도 성실한 삶을 살아가겠습니다. 그리하여 사랑하는 나의 가족들에게 노력하는 아름다운 사람으로 기억되고 싶습니다.

그리고 이다음에 유진이가 크면 그 '외로움'에 대해 얘기해 주고 싶습니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례	
국문요약	
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 재료	3
가. 실험 동물	3
(1) 구강점막 각화상피세포 이식 실험	3
(2) <i>rh</i> IL-1 α 처리 실험	3
나. 구강점막 각화상피세포	3
(1) 세포 배양	3
(2) 세포 생존능 분석	4
(3) 세포 주기 분석	5
(4) 구강점막 각화상피세포의 <i>BrdU</i> 표지	5
2. 방법	5
가. 세포 이식	5
나. 조직학적 관찰 및 재생된 상피의 길이 측정	6
다. 면역조직화학 염색	6
라. <i>Western blot</i> 분석	7
마. <i>rh</i> IL-1 α 처리	7
III. 결과	9
1. 배양된 구강점막 각화상피세포의 생물학적 특성	9
가. 배가 시간	9
나. 세포 주기 분석	9
2. 조직학적 소견 및 재생된 상피의 길이 측정	9
가. 대조군의 조직학적 소견	9

(1) 3일 대조군	9
(2) 1주 대조군	9
(3) 2주 대조군	10
나. 이식군의 조직학적 소견	10
(1) 3일 이식군	10
(2) 1주 이식군	10
(3) 2주 이식군	10
다. 재생된 상피의 길이 측정	11
3. 면역조직화학적 소견	11
가. 3일 이식군	11
나. 1주 이식군	11
다. 2주 이식군	11
4. Western blot 분석	12
가. KGF	12
나. IL-6	12
다. IL-1 α	12
5. rh IL-1 α 처리	12
가. 조직학적 소견	12
나. 재생된 상피의 길이 측정	12
IV. 총괄 및 고찰	14
V. 결론	18
참고문헌	20
영문요약	24

그림 차례

그림 1. 구강점막 각화상피세포의 배가 시간	26
그림 2. 구강점막 각화상피세포의 유세포 분석(<i>flow cytometry</i>)	26
그림 3. 구강점막 각화상피세포의 BrdU 면역조직화학 염색 소견	27
그림 4. 대조군의 조직학적 소견	27
A : 3일 대조군의 조직학적 소견	
B : 1주 대조군의 조직학적 소견	
C : 2주 대조군의 조직학적 소견	
D : 2주 대조군의 창상중심부	
그림 5. 이식군의 조직학적 소견	28
A : 3일 이식군의 조직학적 소견	
B : 1주 이식군의 조직학적 소견	
C : 2주 이식군의 조직학적 소견	
D : 2주 이식군의 창상중심부	
그림 6. 재생된 상피의 길이 측정	29
그림 7. 이식군에 대한 이중 면역조직화학 염색 소견	30
A : 3일 이식군의 창상변연부	
B : 3일 이식군의 창상중심부	
C : 1주 이식군	
D : 2주 이식군	
그림 8. 구강점막 각화상피세포 이식 후 시간에 따른 KGF, IL-6, IL-1 α 의 <i>western blot</i> 분석	31
A : KGF	
B : IL-6	
C : IL-1 α	

그림 9. *rh* IL-1 α 를 처리한 실험군의 조직학적 소견 및 재생된 상피의 길이 측정

..... 32

A : 5일 대조군

B : 5일 *rh* IL-1 α 실험군

C : 재생된 상피의 길이 측정

구강점막 각화상피세포의 피부 재생피화 유도

서론: 배양 세포를 이용하여 조직의 기능적 재생을 얻으려면, 적절한 세포의 선택과 충분한 배양 기간을 거쳐 재건된 조직을 결손부위로 이동시킬 운반체가 필요한데, 자가 구강점막 각화상피세포를 배양하여 부유 형태로 이식하는 방법은 배양에 필요한 시간을 줄이고, 특별한 운반체 없이 간편하게 임상에 적용할 수 있는 장점이 있다.

본 연구의 목적은 일차 배양하여 부유시킨 구강점막 각화상피세포의 창상 치유의 기전에 대한 *in vivo* 연구를 통해, 배양하여 이식된 세포가 창상 결손부에서 생착하여 치유가 이루어지는 것인지, 아니면 이식된 세포에 의해 정상 상피세포가 수혜부의 가장자리로부터 이주하도록 유도(*induction*)되는 것인지를 규명하고, 또한 배양세포의 이식을 통한 창상 치유 과정에서 싸이토카인과의 연관성을 알아보고자 하였다.

연구 방법: 실험 동물로는 8주된 $20 \pm 2g$ 의 암컷 누드마우스를 사용하였다. 구강점막 각화상피세포 이식의 실험에는 이식을 시행하지 않은 대조군과 구강점막 각화상피세포를 이식한 이식군에 각각 15마리가 사용되었고, *recombinant human* IL-1 α (*rh* IL-1 α) 처리 실험에는 5일 대조군과 5일 *rh* IL-1 α 실험군에 각각 3마리가 사용되었다. 구강점막 각화상피세포는 건강한 성인의 제 3 대구치 발치 시 염증이 없는 부위의 치은을 채취하여 일차 배양하였다. 세포 생존능 분석과 세포 주기 분석을 통해 BrdU의 표지 간격을 정하고 이식 전에 배지에 첨가하여 구강점막 각화상피세포에 BrdU를 표지하였다. 누드마우스의 등에 $1.5cm \times 1.5cm$ 크기의 피부 전층 결손부를 형성한 후 수축 방지를 위해 봉합하여 고정하였다. 배양 세포는

1×10^6 cells/40 μ l 가 되게 부유하여 이식하였다. 각각의 군은 술 후 3일, 1주, 2주째에 희생시켜 결손부위에 대한 조직 생검을 실시하였다. 광학 현미경 하에서 조직학적 변화를 관찰하고 영상분석기를 이용하여 재생된 상피층의 길이를 조사하였다. 이식군에 대해서는 *anti-BrdU*와 *anti-cytokeratin(CK) AE1/3*를 이용하여 이중면역조직화학적 평가를 시행하였다. 3일, 1주, 2주의 이식군과 대조군의 생검된 조직으로 *keratinocyte growth factor(KGF)*, *interleukin-6(IL-6)*, *interleukin 1 α (IL-1 α)*에 대해서 *western blot* 분석을 시행하였고, 싸이토카인의 효과를 검증하기 위해서 구강점막 각화상피세포 대신 *rh IL-1 α* 를 처리하여 조직학적 관찰 및 재생된 상피층의 길이를 측정하고 대조군과 비교하였다.

결과: 1. 조직학적 소견 및 영상분석기를 이용한 재생된 상피층의 길이를 측정한 결과, 대조군보다 이식군에서 통계적으로 유의한 빠른 재상피화를 보였다 ($p < 0.05$). 이식군은 2주째에 창상부위의 완전한 재생을 보였으며 재생된 조직은 정상 피부 조직과 유사한 소견을 보였다.

2. 이식군에 대한 이중 면역조직화학 검사 결과, *anti-BrdU*에 양성인 세포는 3일 이식군에서 창상변연부의 이행부위에는 존재하지 않고 창상변연부와 동떨어진 중심부에서 관찰되었고, 1주 및 2주 이식군에서는 관찰되지 않았다.

3. *Western blot* 분석 결과, 이식군은 대조군에 비해 *KGF*, *IL-6*, *IL-1 α* 의 발현이 증가되었고, 시기적으로 각각 다른 단계에서 발현을 보였다.

4. *rh IL-1 α* 실험군은 대조군에 비해 빠른 재상피화를 보였다.

결론: 이러한 결과로 배양된 구강점막 각화상피세포의 이식에 의한 피부 재상피화의 증진은 이식된 세포의 생착에 의한 것이 아니라, 이식된 세포에 의해 정상 상피세포가 수혜부의 가장자리로부터 이주하도록 유도(*induction*)되는 것이며, 이러한 창상 치유의 촉진에는 배양된 각화상피세포와 수혜부 결합조직에서 분비되는 것으로 추정되는 싸이토카인이 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 구강점막 각화상피세포, 일차 배양, 창상 치유, 싸이토카인

구강점막 각화상피세포의 피부 재생피화 유도

연세대학교 대학원 치의학과
(지도 차 인 호 교수)

김 현 실

I. 서 론

구강악안면 영역에서 조직 손상이 발생했을 경우에 이상적인 치료는 원래의 조직으로 완전히 재생시키는 것이다. 자가 재생이 실패할 경우 차선책으로 여러 가지 외과적 재건술이나 의료 제재들이 사용되어 왔다. 그러나 외과적 재건술은 불가피하게 공여부에 손상을 주게 되며, 의료 제재들은 손상된 장기의 원래 기능을 완전히 재현시키기에는 한계가 있다¹.

이러한 단점들을 극복하고자 대체 치료법으로 조직공학과 연계된 재생의학의 개념이 도입되게 되었다. 조직 공학이란 인체의 기능을 회복, 유지, 증진시키기 위하여 생명과학과 공학의 기본 개념과 기술을 통합 응용하여 인공 장기 및 이식 방법의 개발을 연구하는 분야이다². 현재 거의 모든 포유동물의 장기와 조직들이 조직 공학적인 방법으로 응용되기 위해 많은 연구와 임상 실험들이 이루어지고 있다.

자가 상피세포를 배양하여 이식하는 방법은 1981년 화상 환자를 치료하는데 자가 상피세포판(*sheet*)을 처음 사용한 이래로 많은 향상된 방법들이 개발되었다³. 인공 피부에 있어서는 세포만을 이용하는 방법, 세포의 기질만을 이용하는 방법,

세포와 세포외 기질을 혼합한 방법 등 다양한 방법으로 피부 대체물을 만들려는 시도들이 계속되고 있으며, 현재 상품화 단계에 이르렀다^{4,5}.

구강점막을 조직공학적으로 이용하려는 시도는 보다 최근에 이루어졌는데^{6,7,8,9}, 주로 구강점막 각화상피세포와 구강점막 섬유아세포를 사용하거나 구강점막 각화상피세포와 피부 섬유아세포를 이용하여 제작한 다양한 복합 이식물이 개발되었다^{10,11}. 그러나 이러한 복합 이식물은 제작 과정이 복잡하고 시간이 오래 걸리는 문제점이 있다.

구강점막으로부터 상피세포판을 만들어 구강 내 큰 창상이나 피부의 치료에 사용하여 성공한 사례들이 드물게 보고 된 바 있으나^{12,13}, 진피의 간질 성분(*matrix*) 없이 상피 성분만을 사용하는 방법은 상피세포판이 부서지기 쉽고, 창상 수축을 일으키며, 또한 생착률이 일정하지 않는 문제점이 있다^{11,13}.

이러한 단점을 극복하기 위해 세포를 부유하는 방법이 개발되었는데, 세포를 부유시키는 방법은 상피세포판을 이식하는 방법보다 배양에 필요한 시간을 줄이고, 특별한 운반체 없이도 간편하게 분열하는 상피세포를 능동적으로 이식할 수 있는 장점이 있다¹⁴.

실험적으로 배양된 각화상피세포는 과증식된 상태로 나타나며, 정상 상태에서는 관찰되지 않는 싸이토카인을 분비한다고 알려져 있다^{15,16}. 또한, 배양된 각화상피세포로부터 분비되는 싸이토카인은 면역과 염증 반응, 세포 성장, 분화 조절 및 창상 치유와 관련이 있다고 알려져 있다^{17,18,19}.

본 연구의 목적은 일차 배양하여 부유시킨 구강점막 각화상피세포를 누드 마우스의 피부 결손부에 이식하여, 배양하여 이식된 세포가 창상 결손부에서 생착되어 치유가 이루어지는 것인지, 혹은 이식된 세포에 의해 정상 상피세포가 수혜부의 가장자리로부터 이주하도록 유도되는 것인지를 규명하고, 배양 세포의 이식을 통한 창상 치유 과정에서 싸이토카인과의 연관성을 규명하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 실험 동물

생후 8주된 $20 \pm 2g$ 의 암컷 누드마우스(Balb/c Slc-nu, Japan SLC, Inc)를 사용하였다.

(1) 구강점막 각화상피세포 이식 실험

이식을 시행하지 않은 대조군과 구강점막 각화상피세포를 이식한 이식군에 각각 15마리가 사용되었으며 대조군은 3일 대조군, 1주 대조군, 2주 대조군, 이식군은 3일 이식군, 1주 이식군, 2주 이식군으로 각각 5마리씩 분류하였다.

(2) rh IL-1 α 처리 실험

어떠한 이식이나 싸이토카인 처리도 시행하지 않은 대조군과 rh IL-1 α 를 처리한 실험군에 각각 3마리가 사용되었으며, 5일 후 희생시켜 대조군은 5일 대조군, 실험군은 5일 rh IL-1 α 실험군으로 각각 분류하였다.

나. 구강점막 각화상피세포

(1) 세포 배양

구강점막 조직은 연세대학교 치과대학병원 구강악안면외과를 내원한 환자 중 제 3 대구치 발치 시에 제거되는 치은 조직을 환자 동의하에 채득하였다. 구강점막 상피세포의 일차배양은 통상적인 방법에 따라 행해졌다²⁰. 구강점막 조직을 phosphate buffer saline(PBS)로 3회 이상 세척하고, 1~2mm 크기로 잘라 0.15%

collagenase-dispase(Boehringer Mannheim, Germany)로 1시간 처리하였다. 입체 현미경 하에서 상피와 결합조직을 조직 겹자로 분리한 후 상피는 0.25% *trypsin/ethylenediamine tetracetic acid*(GIBCO BRL, U.S.A.)용액에 15분간 처리하여 원심 분리하였다. 구강점막 각화상피세포를 모아 Ca^{2+} -supplemented 0.15mM *keratinocyte growth medium*(Clonetics, U.S.A.)이 든 *collagen-coated plate*(IWA KI, Japan) 위에 분주하였다. 배지는 3일마다 교환해 주며 70~80% 정도로 풍성하게 자라면 냉동 보관 또는 계대 배양을 하였다. 배지는 *keratinocyte basal medium*(Clonetics, U.S.A.)-0.15mM Ca^{2+} , 7.5mg/ml *Bovine pituitary extract*, 0.1µg/ml *epidermal growth factor*(hEGF-B), 5.0mg/ml *insulin*, 0.5mg/ml *hydrocortisone*, *transferrin*, *epinephrine*, 50mg/ml *gentamicin*, 50µg/ml *amphotericin-B*가 포함되도록 하였다.

배양된 구강점막 각화상피세포는 3 *passage*일 때 누드마우스의 피부 창상에 이식해 주었다.

(2) 세포 생존능 분석

BromodeoxyUridine(BrdU)(Sigma, U.S.A.)는 *thymidine*으로 된 *pyridine* 유사체로, 세포주기 중 합성기에 있는 세포의 DNA에 선택적으로 붙어 DNA 합성 중인 세포를 표지할 수 있다. 구강점막 각화상피세포에 BrdU를 표지하기 위한 시간을 정하기 위하여, 세포의 *MTT*[3-(4,5-*dimethylthiazol-2-yl*)-2-*5dipheyl-tetrazolium bromide*](Sigma, U.S.A.) 분석을 통해 배가 시간(*doubling time*)을 측정하였다. 30mm *millicell*(Millipore, U.S.A.) 96 *well plate*에 200µl 당 3×10^3 개의 구강점막 각화상피세포를 분주하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, PBS로 씻어 주었다. 각 세포에 *MTT* 용액을 37°C에서 3시간 처리한 후, 배양액을 버리고 *dimethyl sulfoxide*(DMSO)(Sigma, U.S.A.)로 녹인 다음, *ELX800reader*(Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 방법으로 24, 48, 72, 96시간에 *MTT* 검사를 시행하였다. 24시간을

기준으로 흡광도가 배가 되는 시간을 계산해 구강점막 각화상피세포의 배가 시간을 얻었다.

(3) 세포 주기 분석

구강점막 각화상피세포를 6 well plate에 1.5×10^5 cells/well의 밀도로 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, *trypsin*을 처리하고 PBS로 세척하여 *cold ethanol*(70% v/v)로 고정하였다. 100µg/ml RNase A와 50µg/ml *propidium iodide*(Sigma, U.S.A.)를 사용하여 배양한 다음, Beckton FACStar flow cytometer와 ModFit software를 이용하여 세포 주기를 분석하였다.

(4) 구강점막 각화상피세포의 BrdU 표지

구강점막 각화상피세포에 BrdU를 표지하기 위하여 50~60% 정도로 계대 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 PBS로 두 번 세척하고, 누드마우스에 이식하기 3일 전과 1시간 전에 20µmol/l BrdU를 배지에 첨가하였다. BrdU의 표지 간격은 배양세포의 배가 시간과 세포 주기 분석을 이용하여 결정하였다.

2. 방법

가. 세포 이식

누드마우스에 *Ketamine HCl*(한국유나이트, 한국), *Pentobarbital sodium*(유림, 한국), *Flumoxef sodium*(일동, 한국)을 각각 25mg씩 복강 내로 투여하였다. 누드마우스의 사지를 고정 한 후, 등 부위에 근막상방으로 1.5cm×1.5cm 크기의 피부 전층 결손부를 형성하고, 창상 수축 방지를 위해 정사각형의 각 꼭지점과 각 변의 중간지점에 5/0 *Mersilk*[®](Johnson & Johnson Intl, U.K.)를 이용하여 정상 피부와 결손부 하방의 근육층을 봉합하여 고정하였다. 이식군은 누드마우스의 피부 결손부에

배양 후 BrdU로 표지한 구강점막 각화상피세포를 1×10^5 cells/40 μ l의 농도로 균일하게 처리하였고, 대조군은 이식하지 않고 자연 치유가 되도록 하였다. 생검 후에 조직과 드레싱(dressing)의 분리를 쉽게 하기 위해 바세린을 바른 *lense cleaning tissue*(Watman, U.K.) 3장을 결손부에 얹고, 결손부를 고정하기 위하여 *Elatex*[®] (Alcare Co., Japan)로 그 위를 감았다. 대조군과 이식군은 각 군당 5마리씩 3일, 1주, 2주에 조직 생검을 시행하였다.

나. 조직학적 관찰 및 재생된 상피의 길이 측정

창상의 치유 과정을 관찰하기 위해 이식한 날로부터 3일, 1주, 2주 후에 누드마우스를 에테르를 사용하여 희생시킨 후, 육안으로 관찰되는 실험 부위와 주변 정상 조직이 포함되도록 절개 생검을 하였다. 생검한 조직은 이등분하여 반쪽은 10% 포르말린 용액에 고정하고 파라핀에 포매한 후 조직학적 관찰을 위해 사용하였고, 나머지 반쪽은 *western blot* 분석에 사용하였다. 4 μ m 두께로 연속 절편을 제작하고 *Hematoxylin & Eosin*(H-E)으로 염색하여 광학 현미경으로 조직학적 구조와 상피의 분화를 관찰하였다. 현미경과 CCD 카메라로 연결된 컴퓨터에 조직 소견을 입력하고 *Image-pro plus program*(Media cybernetics, MD, U.S.A.)을 사용하여 입력된 상을 출력한 다음, 창상변연부에서부터 새로 재생된 상피의 길이를 측정하였다. 각 표본의 연속된 5개의 슬라이드에 대해 재생된 상피층의 길이값을 측정하고, *dBase*에 입력하여 통계 분석하였다. 통계학적 분석은 *SAS*(version 6.4) 통계 프로그램을 이용하여 *one-way ANOVA*와 *paired t-test*를 시행하였다($p < 0.05$).

다. 면역조직화학 염색

BrdU와 *cytokeratin*(CK)에 대한 이중 면역조직화학 염색을 위해 파라핀 절편을 *xylene*으로 처리한 후 알콜을 단계적인 농도로 처리하여 흡수시키고, 3% 과산화수소용액에서 내인성 과산화효소를 제거한 다음 PBS로 세척하였다. 0.4% *pepsin*으로 20분간 반응시키고, PBS로 세척하였다. 2N HCl로 30분간 DNA를 변성

(denaturation)시킨 후, PBS로 세척하고 5:1로 희석한 염소 혈청(*goat serum*)으로 차단(blocking)하였다. 일차적으로 *anti-BrdU*(Sigma, U.S.A.)로 12시간 이상 반응시켰다. PBS로 세척한 후 *avidin-biotin complex*(Sigma, U.S.A.)를 반응시켜 3,3'-diamino- benzidine(DAB)(Vector, U.S.A.)로 발색한 후, 다시 염소 혈청으로 차단하고 *pan-cytokeratin marker*인 *monoclonal mouse anti-human cytokeratin, clones AE1/AE3(anti-CK AE1/3)*(Dako, U.S.A.)로 2시간 반응시켰다. 다시 PBS로 세척하고 *avidin-biotin complex*를 반응시켜서, 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)(Vector, U.S.A.)로 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 음성 대조군으로 일차 항체 대신 PBS를 사용하여 반응시킨 조직을 사용하였다.

라. Western blot 분석

사이토카인과 성장인자(KGF, IL-1 α 과 IL-6)의 발현은 *western blot*을 통해 분석하였다. 이식한 지 3일, 1주일, 2주일 후에 대조군과 이식군에서 RIPA buffer (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)를 이용하여 단백질을 각각 추출하였다. 각각의 단백질 중 15 μ g을 10% SDS polyacrylamide gel로 전기 영동한 다음, 전기 영동한 gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 5% dry milk와 0.1% tween-20이 포함된 PBS로 membrane을 차단하고 *monoclonal anti-KGF*(Santa Cruz Biotechnology), *anti-IL-1 α* (Santa Cruz Biotechnology)와 *anti-IL-6*(Santa Cruz Biotechnology)를 각각 반응시켰다. 세척 후 1:2000으로 희석된 *anti-mouse-horseradish peroxidase conjugated*-이차 항체와 반응시켰다. 세척한 후 *enhanced chemiluminescence(ECL) detection kit*(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, U.S.A.)를 사용하여 X-ray 필름에 감광하고 현상하였다. 결과는 영상 분석기(Densitometry TINA 2.0, U.S.A.)를 이용하여 정량하였고, 정량한 결과는 β -actin의 단백질 발현 값으로 교정하였다.

마. rh IL-1 α 처리

싸이토카인의 역할을 검증하기 위해서 구강점막 각화상피세포를 이식하는 대신에 *rh* IL-1 α (R&D, U.S.A.)를 사용하였다. 이전의 방법과 같이 누드마우스의 등에 1.5cm \times 1.5cm 크기의 피부 창상을 만들고 봉합하여 고정하였다. 대조군에는 이식이나 싸이토카인 처리를 시행하지 않았고, *rh* IL-1 α 실험군에는 10ng/ml의 *rh* IL-1 α 를 피부 결손부에 도포하여 처리하였다. *rh* IL-1 α 를 처리한 지 5일 후에 희생시켜 조직학적 관찰 및 재생된 상피의 길이를 측정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 배양된 구강점막 각화상피세포의 생물학적 특성

가. 배가 시간

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

나. 세포 주기 분석

배양된 구강점막 각화상피세포의 20%가 세포 주기 중 증식기(S *phase*)에 있었다(그림 2). 구강점막 각화상피세포에 BrdU를 첨가하여 배양하고 배가 시간 즉, 25시간 후에 *anti-BrdU*를 이용한 면역조직화학 염색을 하였을 때, 모든 세포가 *anti-BrdU*에 대해 양성으로 나타났다(그림 3). 이를 이용하여 이식 후에 배양된 구강점막 각화상피세포의 분포를 *anti-BrdU*를 이용하여 확인하였다.

2. 조직학적 소견 및 재생된 상피의 길이 측정

가. 대조군의 조직학적 소견

(1) 3일 대조군

3일 대조군은 창상변연부에서 중심부를 향해 상피 재생이 미약하게 일어났으며, 창상중심부는 급성 염증반응을 보였다(그림 4A).

(2) 1주 대조군

1주 대조군은 창상변연부에서 중심부를 향해 상피가 재생이 미약하게 일어나고 있었으며 창상중심부는 급만성 염증반응과 육아조직 형성을 보였다(그림 4B).

(3) 2주 대조군

2주 대조군은 부분적인 상피의 재생과 육아조직 형성을 보였다(그림 4C와 4D).

나. 이식군의 조직학적 소견

(1) 3일 이식군

3일 이식군은 창상변연부에서 중심부를 향해 상피가 활발히 재생되고 있는 소견이 관찰되었으며 창상중심부는 급성 염증반응을 보였다. 재생된 상피의 기저세포층은 책상 배열을 이루고 기저세포는 극성을 띄고 있었다. 극세포층이 생겨나고 있었으나, *rete ridge*는 관찰되지 않았다. 재생되고 있는 상피의 일부에선 드문드문 세포 군집이 분산되어 관찰되었다(그림 5A).

(2) 1주 이식군

1주 이식군은 창상변연부에서 중심부를 향해 상피가 활발히 재생되고 있는 소견이 관찰되었으며, 만성 염증반응과 육아조직 형성을 보였다. 일부에서는 상피의 두께는 얇으나 결손부위 전체에 상피화가 일어난 경우도 있었다(그림 5B).

(3) 2주 이식군

2주 이식군은 모두 완전한 상피의 재생을 보였다. 재생된 상피는 정상 피부 상피와 같은 기저세포의 극성과 상피세포로의 분화를 보였으며, 대부분 완전 각화 소견을 보였으나 부분적으로 부진 각화를 보이는 곳도 있었다. 결합조직은 섬유화가 진행되는 소견을 보였다(그림 5C와 5D).

다. 재생된 상피의 길이 측정

H-E로 염색한 조직에서 창상변연부에서 새로 재생된 상피층까지의 길이를 영상 분석기를 이용하여 측정하였을 때, 3일 대조군, 1주 대조군, 2주 대조군에서 재생된 상피층의 길이는 각각 평균 0.73mm(9.7%), 1.88mm(25.1%), 2.99mm(39.9%)였고, 3일 이식군, 1주 이식군, 2주 이식군에서 재생된 상피층의 길이는 각각 평균 3.76mm(50.1%), 6.64mm(88.5%), 7.5mm(100%)였다. 같은 시간에 대조군에 비해 이식군에서 통계학적으로 유의한 상피의 빠른 재생을 보였다($p < 0.05$)(그림 6).

3. 면역조직화학적 소견

가. 3일 이식군

3일 이식군에서 *anti*-CK AE1/3는 기저 세포와 기저상층 세포를 제외한 모든 상피층에서 발현되었고, 창상변연부의 이행부위에 *anti*-CK AE1/3에 양성인 상피층이 두껍게 관찰되었으나, *BrdU*에 양성인 세포는 발견되지 않았다(그림 7A). 창상변연부와 떨어진 중심부에 *anti*-CK AE1/3에 양성인 상피층이 관찰되었으며, 핵이 *anti*-*BrdU*에 양성인 세포들이 *anti*-CK AE1/3에 양성을 보이는 세포들이 발견되었다(그림 7B).

나. 1주 이식군

1주 이식군은 창상변연부와 재생되는 상피층이 모두 *anti*-CK AE1/3에 양성을 보였으나, *anti*-*BrdU*에 양성인 세포는 관찰되지 않았다(그림 7C).

다. 2주 이식군

2주 이식군은 창상중심부를 포함한 전체 상피층이 *anti*-CK AE1/3에 양성을 보

였으나, *anti-BrdU*에 양성인 세포는 관찰되지 않았다(그림 7D).

4. *Western blot* 분석

가. KGF

이식군은 대조군에 비해 *western blot* 상에서 KGF 발현이 약 1.5배 증가되었다. KGF의 발현은 2주째에 최고치를 보였다(그림 8A).

나. IL-6

이식군에서 IL-6은 서서히 증가하다가 1주 때에 최고치를 기록하였다(그림 8B).

다. IL-1 α

이식군에서 IL-1 α 는 3일째에 최고치를 보이다가 3일 이후에는 서서히 감소하였다(그림 8C).

5. *rh* IL-1 α 의 처리

가. 조직학적 소견

IL-1 α 처치군은 대조군에 비해 빠른 재생피화를 보였다(그림 9A와 9B).

나. 재생된 상피의 길이 측정

5일 대조군과 5일 IL-1 α 처치군의 재생된 상피의 길이는 각각 1.17mm와 2.29mm였다. 같은 시간 동안 대조군에 비해 IL-1 α 처치군에서 통계학적으로 유의한 상피의

빠른 재생을 보였다($p < 0.05$)(그림 9C).

IV. 총괄 및 고찰

구강악안면 부위의 외과적 결손부 회복이나 치아 상실에 따른 구강조직의 자연적인 결손부 재생을 위한 조직공학적 치료 방법을 개발하기 위하여 많은 연구들이 시도되고 있다.

배양된 세포를 생체 공여부로 이동시키는 방식은 다양한데, 최근에는 구강점막 각화상피세포를 삼차원적으로 재건하려는 여러 시도들이 있었다²¹. 그러나, 이러한 방법은 물리적인 성질이 부족해서 복합 이식물(*composite*)이 말리거나, 조작이 어렵고, 이식물이 수축하는 등 임상에 적용하기에는 아직 해결되지 못한 문제점들을 안고 있다.

상피세포를 부유하는 방법은 상피세포판을 만들거나 삼차원적인 배양을 하는 방법보다 구조적 재건을 하지 않고도 단순하고 빠르게 세포를 배양할 수 있고, 배양된 세포를 간단하게 이동시킬 수 있어 조작이 쉽고 제작에 드는 시간이 짧은 장점이 있다. Horch는 피부 각화상피세포를 피브린글루(*fibrin-glue*)와 함께 부유시키는 방법으로 누드마우스 피부 결손부에 이식하여 피부상피를 성공적으로 재건하였고, 상피세포판 이식물을 사용하여 이식한 경우와 비교하였을 때 재생피화 차이가 없음을 보고하였다¹⁴.

본 연구에서는 일차 배양한 구강점막 각화상피세포를 누드마우스의 피부 창상에 부유시켜, 피부상피로 재생피화가 유도되면서 창상 치유가 촉진된 것을 관찰할 수 있었다. 이는 상피하방 결체 조직의 재건 없이 구강점막 상피세포만을 이식하여 피부 결손부에 이식해 주었기 때문에 정상 피부 상피의 특징을 유지할 수 있었던 것으로 생각된다. 따라서, 상피세포를 부유하는 방법은 조작이 쉽고 제작이 간단할 뿐 아니라, 기능적인 재건을 할 수 있는 장점이 있다.

Mackenzie는 상피의 분화(*differentiation*)와 상피 특성(*epithelial specificity*)의 유지는 직접적으로 하방 간엽조직(*underlying mesenchymal tissue*)에 의해 좌우된다는 상피간엽조직 상호작용(*epitheliomesenchymal interaction*)을 주장하였다^{22,23}. 이

러한 원리에 근거하여 상피하방 결체 조직의 재건 없이 상피만을 이식하여 정상 상피의 특성을 재현할 수 있다고 한다⁶.

본 연구에서는 대조군에 비해 구강점막 각화상피세포를 이식한 이식군에서 창상 치유가 촉진됨을 알 수 있었다. 조직학적 관찰 및 재생된 상피층의 길이를 측정 한 결과, 3일 대조군과 1주 대조군은 창상변연부에서 중심부로 각각 9.7%와 25.1%의 상피 재생을 보였다. 2주 대조군은 39.9%의 재상피화를 보였다. 반면 3일 이식군은 50.1%의 상피 재생을 보였고, 1주 이식군의 일부와 2주 이식군 전체에서는 완전한 상피의 재생을 보였다. 이식군이 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있는 상피세포의 빠른 재생을 보였다. 따라서 배양하여 이식한 구강점막 각화상피세포가 피부 결손부의 창상 치유를 촉진시키는 것으로 사료된다.

Lauer는 구강암 수술을 시행 받은 후 혀의 운동성이 제한된 환자에서 배양된 자가 구강점막 각화상피세포를 이용하여 혀의 운동성을 회복한 경우를 보고하면서, 이식 전에 배양세포에 BrdU를 표지하고 이식한 지 16일째 이식부위에 대해 생검을 실시하고, 생검된 조직에 대하여 anti-BrdU를 사용하여 면역조직화학 염색을 시행하였을 때, 새로 형성된 점막상피에 배양세포가 융합되어 있음을 보고하였다⁸.

본 연구에서는 배양세포의 분포는 시기별로 변화를 겪을 것이라는 가설 하에, 누드마우스의 피부 창상에 이식한 후에 구강점막 각화상피세포의 분포를 추적하기 위해서 이식 전에 구강점막 각화상피세포에 BrdU를 표지하고 3일, 1주, 2주 후 이식군에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 3일 이식군에서는 BrdU에 양성인 세포가 관찰되었으나, 1주 이식군과 2주 이식군에서는 BrdU에 양성인 세포는 관찰되지 않았다. 이는 이식된 구강점막 각화상피세포가 1주 이전에 세포 사멸 (apoptosis) 과정을 겪기 때문인 것으로 생각된다. 3일 이식군에서 BrdU에 양성을 보이는 세포는 창상변연부의 이행부위에는 관찰되지 않고, 창상변연부와 동떨어진 중심부에서 관찰되었다. 조직학적으로도 이행부위에는 상피층이 새로 두껍게 재생되었고 창상변연부와 동떨어진 중심부에는 드문드문 흩어져 분포하는 상피군집들만이 관찰되었다. 이러한 결과를 통해, 배양된 구강점막 각화상피세포에 의해 피부 창상 치유가 촉진된 것은 이식된 배양 세포의 생착에 의한 치유가 아니라 이식된 세포는 사멸되면서 수혜부의 가장자리로부터 정상 상피세포가 이주한 것으로 생

각된다.

정상 피부는 기저층에서 생성되는 각화상피세포의 수와 표면에서 떨어져 나가는 세포 수 사이에 균형을 이루고 있으나 실험적으로 배양된 각화상피세포는 과증식된 형태로 나타난다. *Gottlieb*와 *Kupper*는 창상 치유과정에서 손상받은 각화상피세포나 실험적으로 배양된 각화상피세포는 정상 상태에서는 관찰되지 않는 싸이토카인을 분비한다고 하였고, 활성화된 각화상피세포(*activated keratinocyte*)로 표현하였다^{15,16}.

활성화된 각화상피세포는 IL-1 α , IL-6나 TGF- α 와 같은 싸이토카인과 성장인자들을 분비한다. IL-1과 IL-6는 급성 염증 단계에서 중요한 매개자로, 세균 감염이나 바이러스 감염, 자외선 조사에 의한 손상, 화상이나 외과적 수술 후에 손상된 세포로부터 분비되는 것으로 알려져 있다. 또한 IL-1은 생체 내에서 자가분비(*autocrine*) 방식을 통해 각화상피세포를 활성화시키며, KGF는 섬유아세포 성장인자 집단(*fibroblast growth factor family*)의 한 성분으로 인체 상피세포에 있어서 *mitogen*으로 작용한다¹⁷.

*Maas-Szabowski*는 *organotypic coculture*를 시행하였을 때, 각화상피세포가 IL-1 신호체계를 통해 공동 배양(*coculture*)되고 있는 섬유아세포를 활성화시키고, 섬유아세포는 KGF를 분비하여 각화상피세포의 성장을 활성화하는 이중 파라크라인 경로(*double paracrine pathway*)에 의해 상피세포의 성장이 조절된다고 하였다^{24,25}. 같은 원리로 배양된 구강점막 각화상피세포에 의해 창상 치유가 촉진되는 것은 각화상피세포와 피부 결손부 섬유아세포에서 싸이토카인 분비가 증가되어 나타난 결과로 유추할 수 있다.

이식한 구강점막 각화상피세포에 의해 피부 창상 치유가 촉진되는 기전은 싸이토카인의 생산을 통한 것이란 가설 아래, 3일, 1주, 2주 이식군과 대조군에 대해 각각 KGF, IL-6, IL-1 α 의 발현을 *western blot*을 이용하여 분석하였다. 그 결과, KGF, IL-6, IL-1 α 의 발현은 대조군에 비해서 이식군에서 증가되었다. 이식군에서 IL-1 α , IL-6, KGF는 3일과 1주, 2주에서 각각 최고치를 기록하여 창상 치유의 과정에서 각각 다른 시기에 발현되었다.

한편, 창상의 재상피화에 있어서 싸이토카인의 역할은 구강점막 각화상피세포의

이식 대신 누드마우스의 피부 창상에 *rh IL-1 α* 를 처리하여, *rh IL-1 α* 처리군이 대조군에 비해 상피의 빠른 재생을 보이는 것을 확인함으로써 검증되었다. 이상의 결과에서, 구강점막 각화상피세포의 이식으로 인해 분비가 촉진된 싸이토카인이 창상의 재생피화를 증진시키는 데 중요한 역할을 한 것으로 생각된다. 이로써 배양된 구강점막 각화상피세포에 의해 피부 창상 치유가 촉진되는 것은 증가된 싸이토카인에 의해 수혜부의 가장자리로부터 정상 상피세포가 이주하도록 유도되는 것임을 알 수 있었다.

일차 배양한 구강점막 각화상피세포를 상피간엽조직 상호작용에 따라 구강점막의 재건뿐 아니라 다른 부위의 점막이나 인공피부로 간편하게 기능적인 재건을 할 수 있을 것으로 생각한다.

한편, 세포를 부유하는 방법은 중력에 영향을 받기 때문에 적용할 창상부위의 제한이 생기는 문제점이 있는데, 세포를 부유시켜 수혜부로 이동시킬 적절한 매개체 (*carrier*)가 개발된다면 이러한 문제점도 극복할 수 있으리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 일차 배양된 구강점막 각화상피세포를 BrdU로 표지하고 누드마우스의 피부 창상에 부유하여 이식한 후, 술후 조직 생검을 실시하고 광학 현미경 검사를 통한 형태학적 특성과 면역조직화학 염색을 통한 생물학적 특성 및 *western blot* 분석을 통한 사이토카인 발현을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 조직학적 소견 및 영상분석기를 이용한 재생된 상피층의 길이를 측정된 결과, 대조군보다 이식군에서 통계적으로 유의한 빠른 재생피화를 보였다($p < 0.05$). 이식군은 2주째에 창상부위의 완전한 재생을 보였으며 재생된 조직은 정상 피부 조직과 유사한 소견을 보였다.
2. 이식군에 대한 이중 면역조직화학 검사 결과, *anti-BrdU*에 양성인 세포는 3일 이식군에서 창상변연부의 이행부위에는 존재하지 않고 창상변연부와 동떨어진 중심부에서 관찰되었고, 1주 및 2주 이식군에서는 관찰되지 않았다.
3. *Western blot* 분석 결과, 이식군은 대조군에 비해 KGF, IL-6, IL-1 α 의 발현이 증가되었고, 시기적으로 각각 다른 단계에서 발현을 보였다.
4. *rh IL-1 α* 처리 군은 대조군에 비해 빠른 재생피화를 보였다.

이상의 연구 결과로 배양된 구강점막 각화상피세포의 이식에 의한 피부 재생피화의 증진은 이식된 세포의 생착에 의한 것이 아니라, 이식된 세포에 의해 정상 상피세포가 수혜부의 가장자리로부터 이주하도록 유도되는 것이며, 이러한 창상치유의 촉진에는 배양된 각화상피세포와 수혜부 결합조직에서 분비되는 것으로

추정되는 싸이토카인이 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. *Science* 1993; 260: 920-6.
2. Nerem RM. *Tissue engineering in the USA*. *Med Biol Eng Comput* 1992; 30: CE8-12.
3. O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H. *Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells*. *Lancet* 1981; 10: 75-8.
4. Eaglstein WH, Falanga V. *Tissue engineering for skin: an update*. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 1007-10.
5. Lee KH. *Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application*. *Yonsei Med J* 2000; 41: 774-9.
6. Ueda M, Hata K, Horie K, Torii S. *The potential of oral mucosal cells for cultured epithelium: a preliminary report*. *Ann Plast Surg* 1995; 35: 498-504.
7. Lauer G. *Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium. Method and clinical application*. *J Craniomaxillofac Surg* 1994; 22: 18-22.
8. Lauer G, Schimming R, Frankenschmidt A. *Intraoral wound closure with tissue-engineered mucosa: new perspectives for urethra reconstruction with buccal mucosa grafts*. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107: 25-33.

9. Lauer G, Schimming R, Gellrich NC, Schmelzeisen R. *Prelaminating the fascial radial forearm flap by using tissue-engineered mucosa: improvement of donor and recipient sites.* *Plast Reconstr Surg* 2001; 108: 1564-72; discussion 1573-5.
10. Imaizumi F, Asahina I, Moriyama T, Ishii M, Omura K. *Cultured mucosal cell sheet with a double layer of keratinocytes and fibroblasts on a collagen membrane.* *Tissue Eng* 2004; 10: 657-64.
11. Izumi K, Feinberg SE, Terashi H, Marcelo CL. *Evaluation of transplanted tissue-engineered oral mucosa equivalents in severe combined immunodeficient mice.* *Tissue Eng* 2003; 9: 163-74.
12. Lauer G, Schimming R. *Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study.* *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59: 169-75; discussion 175-7.
13. Cooper ML, Andree C, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Spielvogel RL. *Direct comparison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes and fibroblasts to an epidermal sheet graft containing human keratinocytes on athymic mice.* *J Invest Dermatol* 1993; 101: 811-9.
14. Horch RE, Bannasch H, Kopp J, Andree C, Stark GB. *Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis.* *Cell Transplant* 1998; 7: 309-17.
15. Rheinwald JG, Green H. *Serial cultivation of strains of human epidermal*

keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975; 6: 331-43.

16. 차인호, 육종인, 손영숙, 이은하, 정소영, 김경주, 김진. 구강점막 각화 상피의 삼차원적 배양과 재건된 조직의 생물학적 특성. 대한 병리학회지 2000; 34: 181-189.

17. Myers S, Navsaria H, Sanders R, Green C, Leigh I. *Transplantation of keratinocytes in the treatment of wounds. Am J Surg* 1995; 170: 75-83.

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

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

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

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

22. Mackenzie IC, Hill MW. *Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse skin. Cell Tissue Res* 1984; 235: 551-9.

23. Hall BK. *A role for epithelial-mesenchymal interactions in tail growth/morphogenesis and chondrogenesis in embryonic mice.* *Cells Tissues Organs* 2000; 166: 6-14.

24. Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE. *Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts.* *J Invest Dermatol* 2000; 114: 1075-84.

25. Maas-Szabowski N, Shimotoyodome A, Fusenig NE. *Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism.* *J Cell Sci* 1999; 112: 1843-53.

Abstract

***Induction of Re-epithelialization in Skin
Wound by Cultured Oral Mucosal
Keratinocytes***

HYUN SIL KIM

*Department of Dental Science, The Graduate School, Yonsei University
(Directed by Professor In Ho Cha, DDS, PhD)*

The aim of this study was to investigate the wound healing effect of primary cultured oral mucosal keratinocytes and to assess their roles in skin wounds. Primary cultured and suspended oral mucosal keratinocytes, labeled with BromodeoxyUridine(BrdU), were scattered onto 1.5cm×1.5cm sized full thickness skin defects of the adult female nude mice in the graft group(N=15), and no grafts were placed in the control group(N=15). They were sacrificed at 3 days, 1 week and 2 weeks after treatment. Histological examination of each wound was performed to review the healing progress by measuring the length from the wound margin to the regenerating epithelial front. The fate of keratinocytes was assessed by double immunohistochemical staining with anti-BrdU and anti-cytokeratin AE1/3 in the graft groups. The wound was completely covered with regenerating epithelia in 2 weeks in the graft group, but was partially covered with regenerating epithelia in the control group. The immunohistochemical studies revealed that most of regenerating epithelial cells was induced from marginal epithelium of the margin, not from the scattered

keratinocytes. Expression of interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-6(IL-6), keratinocyte growth factor(KGF) were determined for both graft and control groups by western blot analysis respectively, which demonstrated that oral mucosal keratinocyte underwent a staged response to wounding by production of pro-inflammatory cytokines(IL-1 α , IL-6) and growth factors(KGF). To verify the effect of the cytokine, human recombinant IL-1 α (rh IL-1 α) was treated instead of oral mucosal keratinocyte transplantation. The IL-1 α treatment group showed faster re-epithelialization than control groups. We could successfully confirm that the graft of primary cultured oral mucosal keratinocytes promotes the regeneration of skin defects. The mechanism of wound healing by primary cultured oral mucosal keratinocytes is considered to be induced by the acceleration of cytokine expression required for re-epithelialization.

Key Words : *Oral mucosal keratinocyte, Primary culture, Wound healing, Cytokine*

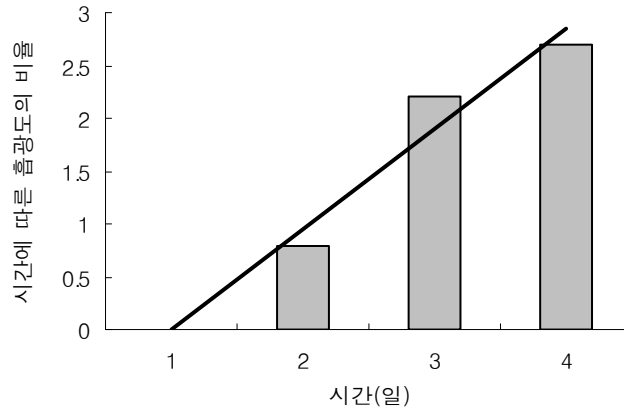


그림 1. 구강점막 각화상피세포의 배가 시간. 배양된 구강점막 각화상피세포의 배가 시간은 25시간이었다.

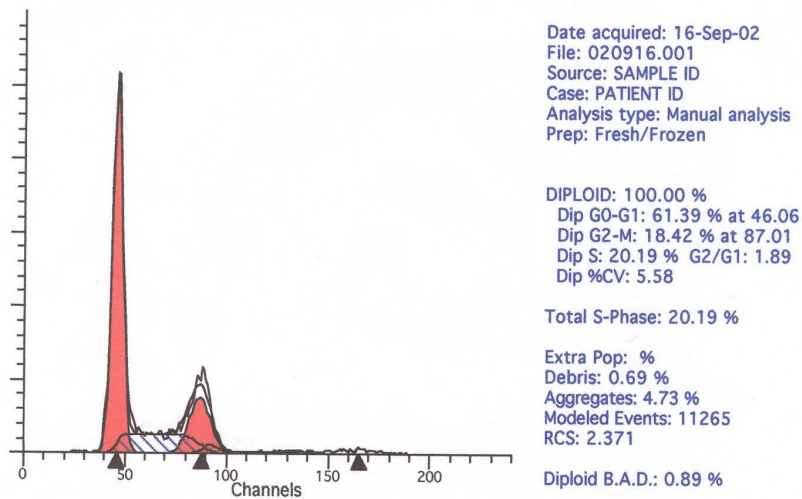


그림 2. 구강점막 각화상피세포의 유세포 분석(*flow cytometry*). 배양된 구강점막 각화상피세포의 약 20%가 세포 주기 중 S *phase*에 있었다.

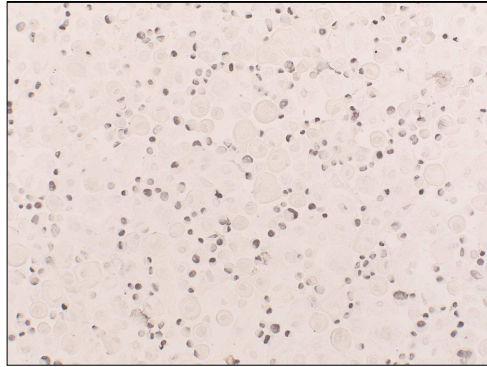


그림 3. 구강점막 각화상피세포의 BrdU 면역조직화학 염색 소견. 구강점막 각화상피세포에 BrdU를 첨가하여 배양하고 배양 시간(25시간) 후에 BrdU에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였을 때, 모든 세포가 양성으로 나타났다. 이를 이용하여 이식 후에 배양된 구강점막 각화상피세포의 분포를 anti-BrdU를 이용하여 확인하였다(BrdU 면역조직화학 염색, DAB발색, $\times 100$).

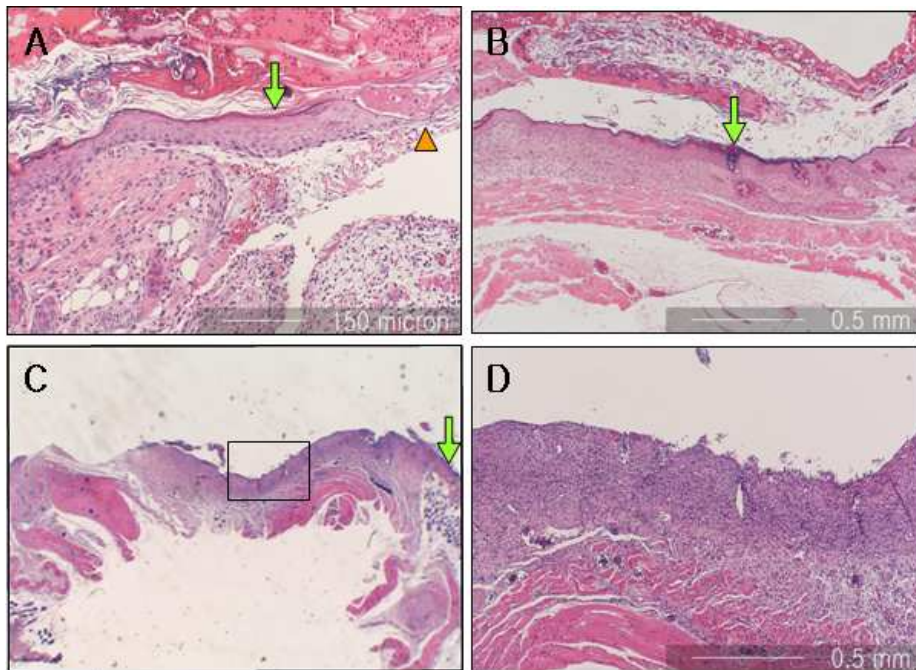


그림 4. 대조군의 조직학적 소견 (A) 3일 대조군의 조직학적 소견. 3일 대조군은 창상변연부에서 중심부를 향해 상피 재생이 미약하게 일어났으며 창상중심부는 급성 염증반응을 보였다. (B) 1주 대조군의 조직학적 소견. 1주 대조군은 부분적인 상피의 재생과 육아조직 형성을 보였다. (C) 2주 대조군의 조직학적 소견. 2주 대조군은 부분적인 상피의 재생과 육아조직 형성을 보였다. (D) 2주 대조군의 창상중심부. 그림 4C의 네모상자를 확대한 사진. 2주 대조군의 창상중심부에서는 상피의 재생이 관찰되지 않았다(H-E, A: $\times 100$, B, D: $\times 40$, C: $\times 10$; scale bar; A: 150 μm , B, D: 0.5mm, 연두색 화살표: 창상변연, 주황색 화살표: 재생되는 상피의 최전방부).

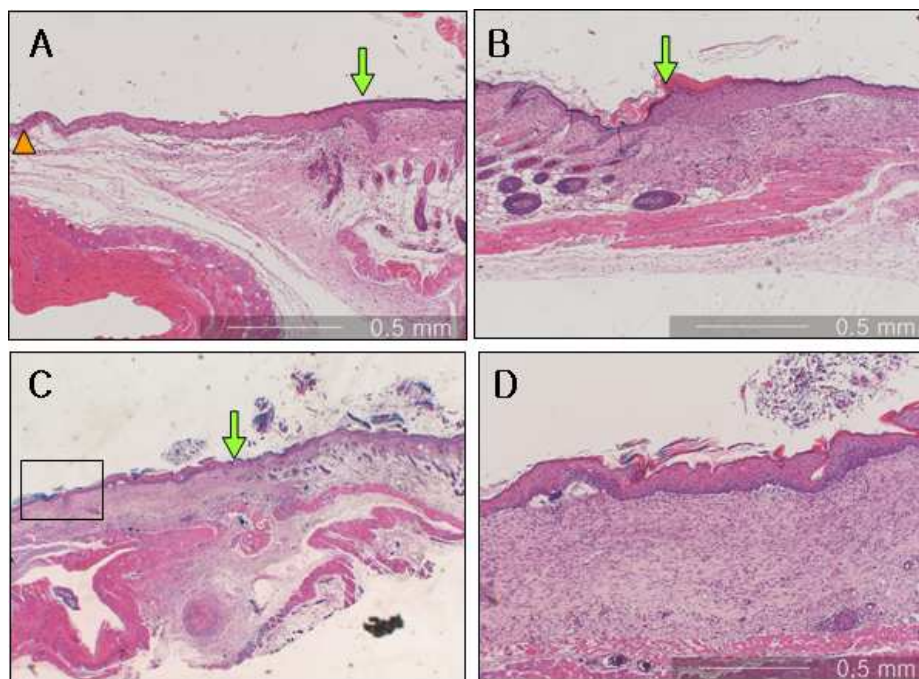


그림 5. 이식군의 조직학적 소견 (A) 3일 이식군의 조직학적 소견. 3일 이식군은 창상변연부에서 중심부를 향해 상피가 활발히 재생되고 있는 소견이 관찰되었으며 창상중심부는 급성 염증반응을 보였다. 재생된 상피의 기저세포층은 책상 배열

을 이루고 기저세포는 극성을 띄고 있었다. 극세포층이 생겨나고 있었으나, *rete ridge*는 관찰되지 않았다. (B) 1주 이식군의 조직학적 소견. 1주 이식군은 창상변연부에서 중심부를 향해 상피가 활발히 재생되고 있는 소견이 관찰되었다. (C) 2주 이식군의 조직학적 소견. 2주 이식군은 완전한 상피의 재생을 보였다. 재생된 상피는 정상 피부 상피와 같은 기저세포의 극성과 상피세포로의 분화를 보였으며, 대부분 완전 각화 소견을 보였으나 부분적으로 부전 각화를 보이는 곳도 있었다. 결합조직은 섬유화가 진행되는 소견을 보였다. (D) 2주 이식군의 창상중심부. 그림 5C의 네모상자를 확대한 사진. 2주 이식군의 창상중심부에서는 상피의 재생이 관찰되었다(H-E, A, B, D: $\times 40$, C: $\times 10$; scale bar; A, B, D: 0.5mm, 연두색 화살표: 창상변연, 주황색 화살표: 재생되는 상피의 최전방부).

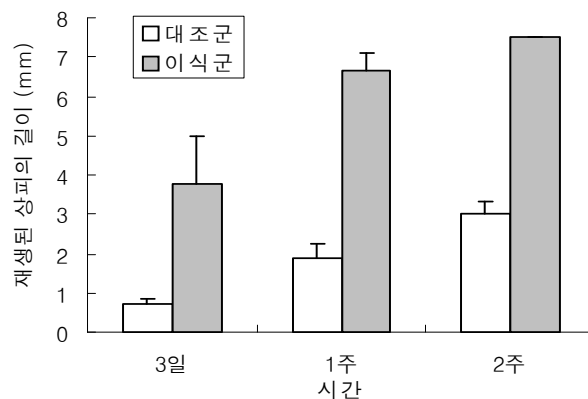


그림 6. 재생된 상피의 길이 측정. 영상분석기를 이용하여 재생된 상피의 길이를 측정하였을 때, 이식군은 대조군에 비해 통계적으로 유의한 상피의 빠른 재생을 보였다($p < 0.05$).

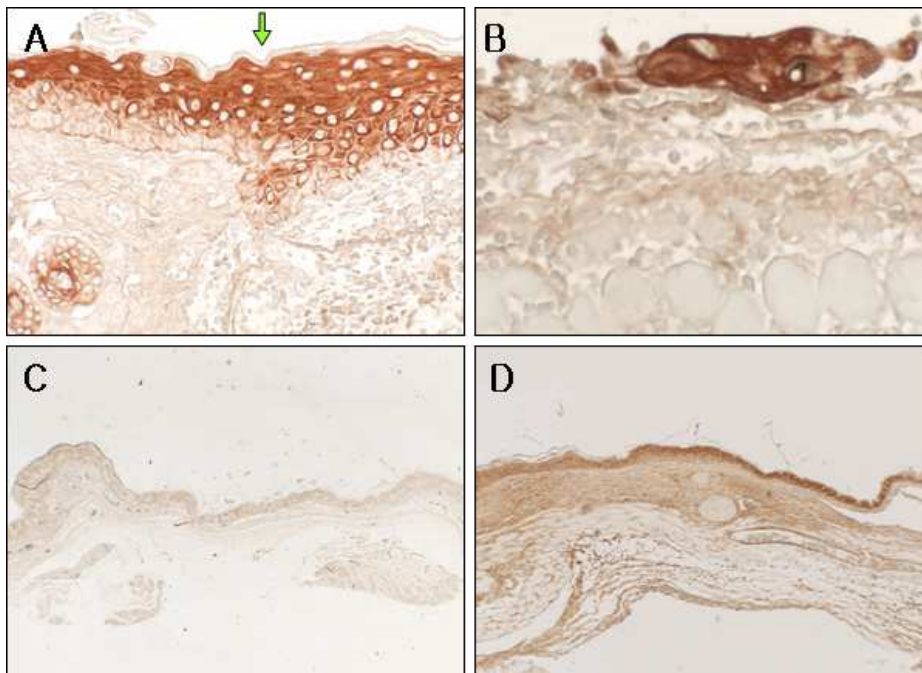


그림 7. 이식군에 대한 이중 면역조직화학 염색 소견. (A) 3일 이식군의 창상변연부. 3일 이식군의 창상변연부는 *anti*-CK AE1/3(+)/*anti*-BrdU(-)였다. *Anti*-CK AE1/3는 기저 세포와 기저상층세포를 제외한 모든 상피층에서 발현되었고 창상변연부에서 재생되는 상피로의 이행부위는 상피층이 두꺼워져 있었고, *anti*-BrdU에 양성인 세포는 관찰되지 않았다. (B) 3일 이식군의 창상중심부. 3일 이식군의 창상중심부는 *anti*-CK AE1/3(+)/*anti*-BrdU(+)였다. *Anti*-CK AE1/3에 양성을 보이는 세포군집이 드문드문 분산되어 발견되었는데, 이들 세포의 세포질은 *anti*-CK AE1/3에 양성을 보이고, 핵은 *anti*-BrdU에 양성이었다. (C) 1주 이식군, (D) 2주 이식군. 1주 이식군, 2주 이식군의 재생되는 상피는 각각 *anti*-CK AE1/3(+)/*anti*-BrdU(-)였다. BrdU로 표시하여 이식한 구강점막 각화상피세포는 1주와 2주에는 관찰되지 않았다(*anti*-BrdU와 *anti*-CK AE1/3에 대한 이중 면역조직화학 염색, DAB & AEC 발색, A: $\times 100$, B: $\times 200$, C, D: $\times 10$, 연두색 화살표: 창상변연).

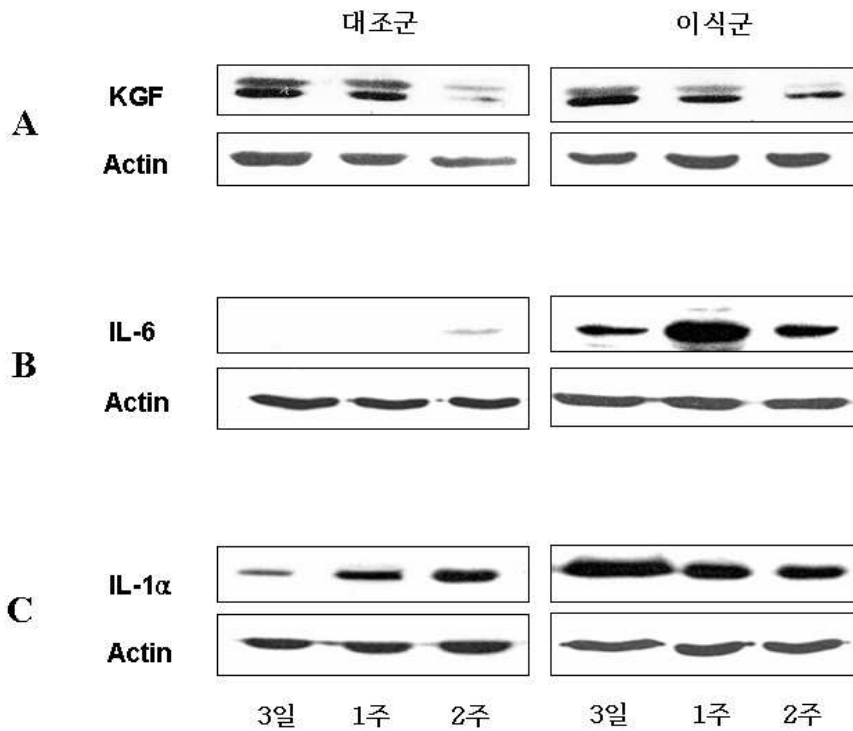


그림 8. 구강점막 각화상피세포 이식 후 시간에 따른 KGF, IL-6, IL-1α의 *western blot* 분석. 이식군은 대조군에 비해 *western blot* 상에서 증가된 KGF, IL-6, IL-1α의 발현을 보였다. 이식군에서 IL-1α는 3일째에, IL-6는 1주째에, KGF는 2주째에 증가된 양상을 보여, 시기적으로 각각 다른 단계에서 싸이토카인의 발현을 보였다. 정량한 결과는 β-actin의 단백질 발현 값으로 교정하였다. (A) KGF (B) IL-6 (C) IL-1α.

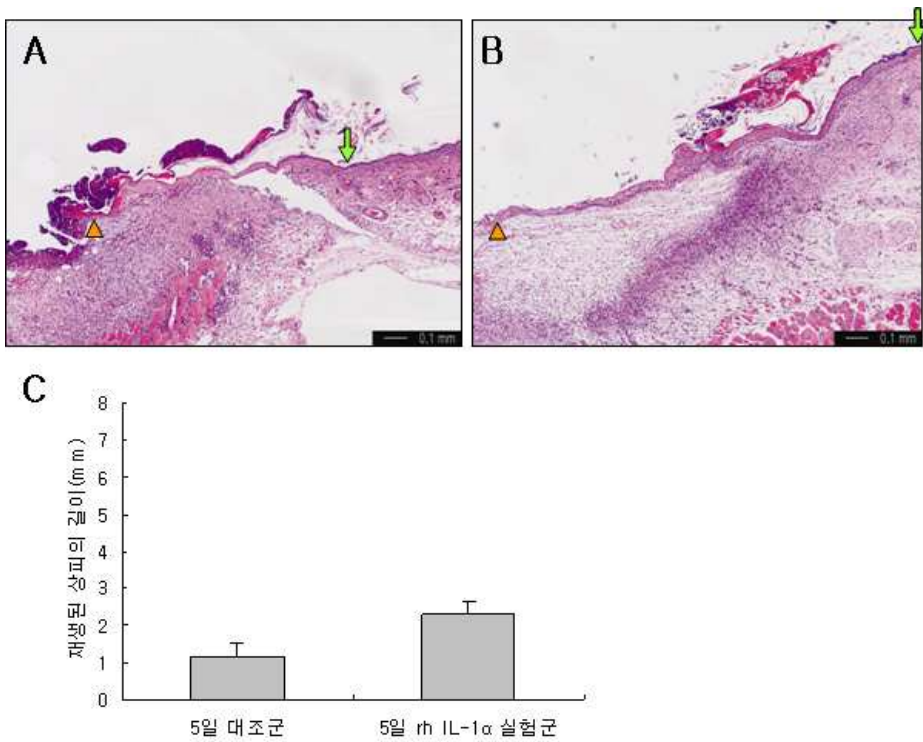


그림 9. *rh IL-1 α* 를 처리한 실험군의 조직학적 소견 및 재생된 상피의 길이 측정. 사이토카인의 역할을 규명하기 위해 구강점막 각화상피세포를 이식하는 대신, 누드마우스의 피부 창상부위에 10ng/ml의 *rh IL-1 α* 을 처리하였다. *rh IL-1 α* 처치군은 대조군에 비해 빠른 재상피화를 보였다. (A) 5일 대조군 (B) 5일 *rh IL-1 α* 실험군(H-E, $\times 40$; scale bar, 0.1mm, 연두색 화살표: 창상변연, 주황색 화살표: 재생되는 상피의 최전방부) (C) 재생된 상피의 길이 측정. 5일 대조군과 5일 *rh IL-1 α* 실험군의 재생된 상피의 길이는 각각 1.17mm와 2.29mm였다. 대조군에 비해 *rh IL-1 α* 실험군에서 통계적으로 유의한 상피의 빠른 재생을 보였다($p < 0.05$).