

치은상피의 배양에 관한 연구

최병호* · 박주영** · 최성호*** · 고춘명** · 이종영****

*연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실(원주기독병원)

**연세대학교 원주의과대학 미생물학교실

***연세대학교 치과대학 치주과학교실

****연세대학교 원주의과대학 치료방사선학교실

Abstract

A STUDY ON THE CULTURE OF THE GINGIVAL EPITHELIUM

Byung-Ho Choi*, Joo-Young Park**, Seong-Ho Choi***,

Choon-Myung Koh**, Jong-Young Lee****

*Dept. of Oral & Maxillofacial Surg, College of Dentistry, Yonsei University

**Dept. of Oral & Microbiology, Wonju College of Medicine, Yonsei University

***Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University

****Dept. of Radiation Oncology, Wonju College of Medicine, Yonsei University

In order to use cultured oral mucosa for the coverage of epithelial defects in the mouth, we cultured epithelial cells of the gingiva and examined them morphologically. Using the method described by Rheinwald and Green we achieved a wide mucosal sheet consisting of 3-7 cell layers after 3-5 weeks. The cells of the layers were morphologically well differentiated.

Key words : culture, gingival epithelium

I. 서 론

구강내 치은상피의 결손부위를 치료하는 방법은 지금까지 여러가지가 개발되었다. 주로 사용한 방법으로는 치은상피의 절손부위가 적은 구상전경형 성술이나 치은퇴축부위를 덮는 수술시 구개부위에서 점막을 채취하여 결손부위에 이식을 시행하였으며¹⁾, 치은상피의 결손부위가 큰 경우에는 구강내에서 채취할 수 있는 치은상피의 양으로는 부족하여 피

부이식을 이용하였다. 피부를 구강내에 이식한 경우 피부의 상피가 주변 구강점막과 다른 성질을 가지며 경우에 따라 수년동안 피부의 고유한 특성을 유지하며²⁾, 또한 피부를 채취한 부위에 새로운 창상을 만드는 단점이 있다. 따라서 치은상피의 결손부위를 구강내에서 소량 채취한 치은상피를 시험관내에서 배양하여 이식하려는 시도가 있었다.

피부상피세포의 배양은 화상의 치료를 위해 많이 개발되어 이식에 성공적으로 사용되었으나^{3, 6, 7, 8)}, 치

※본 논문은 1993년도 연세대학교 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

은상피세포의 배양은 주로 치과재료나 약제에 대한 상피세포의 반응검사를 위해 이용되어 왔으며^{9,10)} 이식을 위한 치은상피세포의 배양에 관하여는 보고된 바가 매우 적다¹¹⁾. 지금까지 우리나라에서는 화상치료를 위한 피부배양에 관한 문헌보고는^{12,13)} 있었으나 치은상피세포의 배양에 관한 보고는 없었다. 저자들은 환자의 구강내에서 얻은 일부 구강점막을 시험관내에서 배양하여 이식을 위한 충분한 넓이의 치은상피조직을 얻는데 성공하여 그 배양방법과 배양된 상피세포조직의 형태학적인 특성에 관하여 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

(1) 치은 상피세포의 분리

실험에 사용한 치은조직편은 본 병원 외래에서 매복지치발치시 0.5cm×0.3cm의 크기의 치은조직을 채취하여 사용하였다. 채취한 치은조직편은 즉시 MEM(Minimum Essential Medium)에 넣어 실험실로 운반하였다. 5%의 항생제용액이 첨가된 MEM으로 2회 세척한 후 매스를 사용하여 치은조직편에서 결체조직을 제거해 내고, 남은 상피층을 가위로 분쇄하였다. 분쇄한 상피층을 1% trypsin용액에 넣어 30분동안 배양기내에 방치한 후 10분간 원심분리하여 trypsin용액을 버리고 새 trypsin용액을 넣고 다시 30분동안 배양기내에 넣어 두었다. 이러한 trypsin 처리를 3번 반복하였다. trypsin 처리가 끝난 세포들을 MEM으로 3번 세척하였다.

(2) 3T3섬유모세포층의 준비

25cm² culture flask에 3T3섬유모세포를 MEM배지를 이용하여 배양하여 3T3섬유모세포가 culture flask바닥을 성글게 한 층의 세포로 덮을 때까지 배양한 후 electron 방사선을 이용하여 60Gy의 방사능을 조사하였다.

(3) 치은상피세포의 배양

방사선 조사된 3T3섬유모세포층위에 trypsin 처리로 분리된 상피세포들을 심종하였다. 상피세포의 증식을 위해 사용된 배양액은 MEM과 Nutrient Mixture F12를 3:1의 비율로 혼합한 것을 기초배지로 하여 여기에 10% fetal calf serum, 1% cholera toxin, 1% hydrocortisone, 1% transferin, 1% insu-

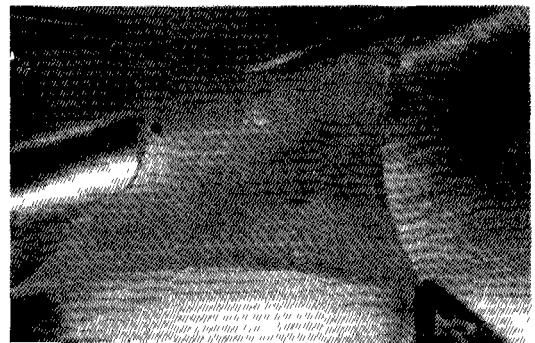
lin, 0.01% epidermal growth factor를 첨가한 것을 사용하였다. 배양액은 2-3일 간격으로 교환 공급하였다.

(4) 배양된 상피조직의 분리와 관찰

전도 광학현미경으로 관찰하여 치은상피세포가 culture flask의 바닥을 완전히 덮으면 0.3% dispase를 상피세포층위에 넣고 배양기에서 40-60분간 두어 culture flask바닥에서 상피세포조직이 유리되면 절단하여 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

III. 결 과

단일 상피세포는 1-2일후 culture flask의 바닥에 부착되어 있는 3T3섬유모세포층에 붙어서 증식을 시작하였으며 7-10일째 콜로니(colony)가 보였다. 콜로니가 자라면서 3T3섬유모세포층은 콜로니의 주변에서 밀려나가는 것을 관찰할 수 있었다. 콜로니에 있는 세포들이 처음에는 단일 상피세포층을 형성하였으나 콜로니가 자라면서 성층현상(stratification)이 나타났다. 콜로니는 자라면서 인접한 콜로니와 서로 연결되었으며 3-5주후 culture flask바닥 전체에 상피세포층을 형성하여 약 25cm²의 크기의 상피조직편이 형성되었다. 상피세포층을 형성하는 과정에서 표면에서 표피가 벗겨져 나왔으며 증식속도는 나이가 많은 환자보다 어린 환자에서 더 빨랐다. Culture flask바닥에 붙어 있는 상피조직은 dispase(Boehringer Mannheim)의 처리로 손상없이 바닥에서 분리되었으며 분리된 상피조직은 반투명하고 탄력성이 있었다(사진1). Dispase처리과정을 거치는 중에 조



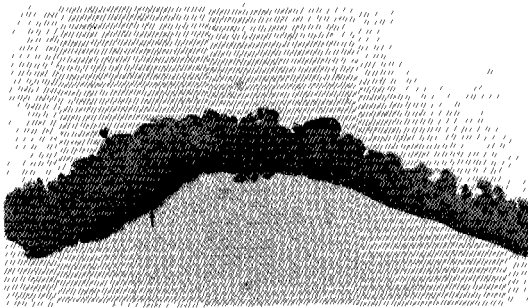


사진2. 배양된 치은상피조직의 광학현미경모습.
HE. X400
↑(기저세포층)

직편은 그 면적이 약 60% 축소되는 현상을 보였다.

조직편을 수직으로 절단하여 광학현미경으로 관찰한 결과 성층현상이 이루어져 있었으며 3-7층의 세포층을 볼 수 있었다(사진2). 모든 세포층에서 핵은 명백하였으며 가장 아래층의 세포들은 크고 뚜렷한 핵을 가진 반면 세포질이 빈약하여 정상상피의 기저세포층과 유사한 양상을 보였다. 상부의 세포들은 stratum spinosum의 세포와 비슷한 양상을 보였다. 전자현미경으로 관찰한 결과 상부의 세포들은 세포막에서 microvilli를 내고 있었고, 세포와 세포사이에는 넓은 세포간격(intercellular space)을 볼 수 있었다. 세포와 세포들은 desmosome에 의하여 서로 연결되어 있었고(사진3), 가장 아래층의 세포들은 culture flask바닥쪽으로 hemidesmosome을 형성하고 있었다. 세포내에서 많은 tonofibril과 granule이 관찰되었다.

IV. 고 찰

구강점막의 설손부위를 치료하는 최선의 방법은 결손부위의 점막과 같은 정질의 점막을 환자자신에서 채취하여 이식하는 것이지만 공여부위의 제한으로 어려움이 있다. 특히 치아와 치주조직의 건강과 유지지지를 위해 필요한 부착성 치은(attached gingiva)은 제한된 양이어서 넓은 부위의 구강전정형성술이나 구강암절제후 재건시 필요한 양을 구강내에서 채취하기가 불가능한 경우가 많다. 이런 경우 환자의

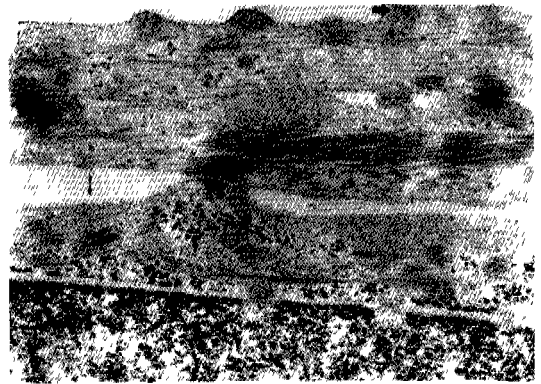


사진3. 배양된 치은상피조직의 전자현미경모습.
X8000
◆(세포간격), ↑(granule), ∩(desmosome), ⊕(tonofibril), ↑(microvilli)

구강내에서 얻은 일부 구강점막을 배양으로 충분한 넓이의 치은 조직으로 증식시켜서 환자에게 이식하는 방법이 연구되었다. 배양방법으로는 섬유모세포의 증식을 배제하고 상피세포만을 선택적으로 빨리 증식시킬 수 있는 배지를 이용하여 culture flask의 플라스틱위에 상피세포를 배양하는 방법이 있고^{11, 14, 15, 16)}, 또한 점종한 상피세포가 바닥에 부착되는 효과와 콜로니형성효율을 높이기 위하여 collagen gel을 이용하는 방법이 있고^{17, 18)}, 또 다른 방법으로는 Rheinwald와 Green에¹⁹⁾ 의하여 소개된 방사선 조사한 3T3 섬유모세포층위에 상피세포들을 배양하는 방법 등이 있다. 본 연구에서는 Rheinwald와 Green이¹⁹⁾ 피부 각화상피세포를 배양하는데 사용한 방법으로 구강 상피세포를 배양하여 상피세포의 점종시 오염될 수 있는 섬유모세포의 증식이 3T3섬유모세포로 억제되고 높은 상피세포의 부착율과 높은 콜로니형성효율을 관찰할 수 있었다.

세포배양에서 얻을 수 있는 조직의 양은 3-5주 간의 일차배양에서 25cm² culture flask바닥을 모두 덮는 넓이의 상피세포조직을 얻을 수 있었으며 또한 계대배양이 가능하여 일차배양된 상피세포를 분리해서 배양하여 25cm² culture flask넓이의 상피세포 조직을 여러 개 얻을 수 있었다. Dispase로 상피세포조직을 culture flask바닥에서 분리시켰을 때 조직은 약 60% 수축하여 약 10cm²의 넓이가 되었다. 설국 0.3cm×0.5cm(15mm²)의 조직편에서 이식가능한 상태의 상피세포조직의 양은 일차배양에서 약 10cm²

얻을 수 있어 약 70배 증가된 상피세포조직을 얻을 수 있었다. Dispase로 분리시킨 상피세포조직은 반투명하고 탄력성이 있었다. 그러나 말려 들어가는 성질이 있어 퍼서 다른 부위로 옮기는데 어려움이 있었다. 조직의 두께는 평균 0.03-0.1mm로 매우 얇아 이식에 사용했을 경우 창상수축량이 많을 것으로 사료되며, 만약 구강내에 이식을 위해 사용할 경우 이식부위의 운반과 고정을 위해 특별한 방법을 고안해야 할 것으로 생각된다. 화상환자를 위한 피부상피세포의 배양에 관한 문헌에는 이와같은 단점을 보완하기 위해 여러가지 배양방법이 보고되었다. Bell등⁸⁾, Tmois등²⁰⁾, Karasek²¹⁾은 collagen lattice위에 피부상피세포를 배양하여 폴라젠과 함께 이식에 사용하였으며, Pruniéras등²²⁾, Asselineau등²³⁾은 공기중에 노출시킨 상태로 배양하여 성충현상을 증가시켰다. 앞으로 구강상피세포도 이식을 위해 사용하기 위해서는 진피층위에 또는 진피층에 해당하는 부분위에 구강상피세포를 배양하는 방법에 연구가 필요한 것으로 생각된다.

본 연구에 사용된 세포배양법으로 배양된 치은상피세포조직은 3-7층의 상피세포로 구성되어 있었으며, 모든 층에서 세포들은 분화가 잘 되어 있었으며 뚜렷한 핵을 가지고 있었다. 기저층의 세포와 상부의 세포간에 형태학적 차이가 있었으며 상부의 세포들은 입방형이었으며 가시층(stratum spinosum)의 세포와 비슷하였고 최상부의 세포들은 미세융모(microvilli)를 내고 있었다. 세포간격은 정상조직에서 보다 상당히 넓었으며 세포와 세포가 서로 연결되는 부위에는 desmosome이 있었다. 세포질에는 많은 필라멘트 다발(filament bundle)을 가지고 있었으며 이들은 당김원섬유(tonofibril)을 형성하고 있었다. Desmosome과 당김원섬유는 모든 세포에서 흔히 관찰되었다. 또한 세포질에서 많은 과립(granule)이 관찰되었다. 기저층의 세포들은 플라스틱바닥 쪽으로 hemidesmosome을 형성하고 있었으며 이 hemidesmosome에 의하여 상피세포가 바닥에 부착하고 있는 양상을 보였다. 정상 치은조직과 비교할 때 각질층(stratum corneum), 투명층(stratum lucidum), 과립층(stratum granulosum)을 구분해 낼 수 없었고, rete peg의 형성이 없었다. 앞으로 배양조건을 변화시켜 정상적인 구강점막과 구조적으로 더 동일한 점막으로 배양하는데 더 많은 연구가 필

요하리라 생각된다.

V. 결 론

구강내에서 소량 채취한 치은상피를 시험관내에서 배양하여 치은상피의 결손부위에 이식하려는 목적으로 Rheinwald와 Green에 의한 방법으로 구강상피세포를 배양하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 배양으로 이식을 위한 충분한 넓이의 치은상피세포조직을 얻을 수 있었으며 배양한 조직은 3-7층의 성층을 이루고 있었으며 각 층의 세포들은 모두 분화가 잘 되어 있었다. 그러나 두께가 매우 얇고 말려 들어가는 성질이 있어 앞으로 적당한 두께와 안정성을 가지도록 하기위해 진피층 또는 진피층에 해당하는 부분위에 구강상피세포를 배양하는 방법과 정상 구강점막과 구조적으로 더 동일한 점막으로 배양하는데 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

1. Bjorn, H. : Free transplantation of gingiva propria. *Odontol. Rev.* 14 : 323, 1963.
2. Sullivan, H. C., Atkins, H. : Free autogenous gingival grafts. III. Utilization of grafts in the treatment of gingival recession. *Periodontics* 6 : 152, 1968.
3. Umeda, T. : Experimental autotransplantation of full thickness skin into the mouth. *Oral Surg.* 23 : 709, 1969.
4. Dellon, A. L., Tarpley, T. M., Chretien, P. B. : histologic evaluation of intra oral skin grafts and pedicle flaps in human, *J. Oral Surg.* 34 : 789, 1976.
5. O'Connor, N. E., et al. : Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells, *Lancet* 10 : 75, 1981.
6. Carney, S. A. : Generation of autograft : the state of the art. *Burns* 12 : 231, 1986.
7. Latarjet, J., et al. : The grafting of burns with cultured epidermis as autografts in man. *Scan. J. Plast. Reconstr Surg.* 21 : 241, 1987.
8. Bell, E., et al. : Living tissue formed in vitro

- and accepted as skin equivalent tissue of full thickness. *Science* 211 : 1052, 1981.
9. Shakespeare, V., Shakespeare, P. G., Evans, B. T. : Effects of proprietary oral rinses containing chlorhexidine, hexetidine and benzydamine on the proliferation of human buccal epithelial cells in culture, *Archs Oral Biol.* 33 : 881, 1988.
 10. Hehner, B., Heidemann, D. : Vergleich der biologischen Verträglichkeit von Titan and Titanlegierungen in der Zellkultur menschlicher Gingiva. *Z. Mund-Kiefer-Gesichts-Chir.* 13 : 394, 1989.
 11. Leuer, G, et al : Cultured gingival epithelium. *J. Cranio-Max.-Fac. Surg.* 19 : 21, 1991.
 12. 장해장 외 : 인체 상피세포의 시험관내 배양에 관한 연구. *대한성형외과학회지.* 10 : 269, 1983.
 13. 박호천 외 : 배양된 상피세포를 이용한 광범위 화상의 치료와 피부재건에 관한 연구. *외과학회지.* 37 : 135, 1989.
 14. Price, F M., et al : A new culture medium for human skin epithelial cells. *In Vitro* 21 : 147, 1980.
 15. Peehl, D. M., Ham, R G. : Clonal growth of human keratinocytes with small amounts of dialyzed serum. *In Vitro.* 16 : 526, 1980.
 16. Pittelkow, M. R., Scott, R. E. : New techniques for the in vitro culture of human skin keratinocytes and perspectives of their use for grafting of patients with extensive burns. *Mayo Clin. Proc.* 61 : 771, 1986.
 17. Bell, E., Merrill, C., Solomon, D. : Characteristics of a tissue equivalent formed by fibroblast cast in a collagen gel. *J. Cell Biol.* 83 : 398a, 1979.
 18. Lillie, J. H, MacCallum D. K., Jepsen, A. : Growth of stratified squamous epithelium on reconstituted extracellular matrices : long-term culture. *J. Investigative Dermatology* 90 : 100, 1988.
 19. Rheinwald, J. G., Green, H. : Serial cultivation of strains of human keratinocytes : formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 331, 1975.
 20. Tinois, E., et al. : In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute, *Experimental Cell Res.* 193 : 310, 1991.
 21. Karasek, M. A. : Culture of human keratinocytes in liquid medium. *J Investigative Dermatology* 81 : 24s, 1983.
 22. Prumieras, M., Woodley, D. : Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Investigative Dermatology* 81 : 28s, 1983.
 23. Asselineau, D, et al. : Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. *Exp. Cell Res* 159 : 536, 1985.