

## 구강점막의 배양에 관한 연구

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실(원주기독병원)  
최병호 · 유재하

### A METHOD OF MUCOSA CULTURE

Byung-Ho Choi, Jae-Ha Yoo

Department of Oral Maxillofacial Surgery, College of Dentistry Yonsei University

*To use cultured mucosa as a graft of full thickness, our laboratory has been involved in the development of techniques to grow epidermis together with connective tissue. Human oral mucosa was obtained at dental surgery. Under sterile conditions the tissues were cut into explants of 0.1 cm<sup>2</sup> which were placed in the center of 24 well tissue culture dishes and incubated in a growth medium. The growth medium used for epithelial cells was MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 10% fetal calf serum, 0.5% dimethyl sulfoxide, glutamine (0.292 g/l), epidermal growth factor (40 ug/ml), cholera toxin (30 ng/ml), hydrocortisone (2 ug/ml), insulin (40 ug/ml) and transferin (5 ug/ml). The medium used for stratification of epithelial cells was MEM supplemented with 10% fetal calf serum, 0.5% dimethyl sulfoxide and glutamine (0.292 g/l). The medium used for fibroblasts was MEM supplemented with 10% fetal calf serum. With the three types of media used alternatively, a mucosa composed of epidermis and connective tissue was obtained after 3 weeks of culture.*

*Key words* : culture, epithelium, mucosa

#### I. 서 론

구강내 점막의 결손부위가 넓은 경우 결손 부위를 치료하는데 주로 사용한 방법은 피부 이식이다. 그러나 피부이식을 하게되면 이식한 피부의 상피가 주변 구강점막과 다른 성질을 가지며 경우에 따라 수년동안 피부의 고유한 특성을 유지하며, 또한 피부채취한 부위에 새로운 창상을 만드는 단점이 있다<sup>1,2)</sup>. 그러므로 넓은 구강점막의 결손부위를 치료할 수 있는

다른 방법을 개발할 필요가 있다. 그동안 시도된 방법으로 환자의 구강내에서 채취한 소량의 점막을 넓은 구강점막의 결손부위를 덮을 수 있도록 충분한 넓이의 구강점막으로 증식시킬 수 있는 배양방법의 사용에 대한 관심이 증가하여 왔다.

Arenholt-Bindslev<sup>3)</sup>, Lauer<sup>4)</sup>, 최<sup>5)</sup> 등이 보고한 논문에서 이식에 사용하기 위하여 치은 상피세포를 배양하는 방법을 보고하고 있다. 그러나 이 방법은 치은상피세포만으로 구성된

\* 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

막으로 배양하여 조직의 두께가 매우 얇아 이식을 위한 조각과 운반, 고정이 어렵고 또한 이식후에도 창상수축이 많은 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 Bell등<sup>1)</sup>은 섬유모세포를 배양한 후 콜라젠 (Collagen)으로 고정하여 진피에 해당하는 층을 만들어 그위에 상피세포를 배양하는 방법을 개발하였다. 그러나 이 방법은 이물인성(xenogenous)인 인조진피를 사용하는 단점이 있다. 현재까지 환자 자신의 상피세포와 섬유모세포를 함께 자라게 하여 진피층과 상피층으로 이루어진 구강점막으로 배양하는 방법에 관하여는 보고된 것이 없다. 그리하여 본 연구에서는 환자자신에게서 채취한 소량의 구강점막을 시험관에서 결합조직층과 상피층으로 구성된 구강점막으로 배양한 방법을 보고하고자 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에 사용한 구강점막은 본 병원에서 매복지치발치 등의 외과적 치과술시  $0.5 \times 1 \text{ cm}^2$  크기의 구강점막을 채취하여 사용하였다. 배양을 위한 배지는 3가지 종류의 배지를 사용하였다. 즉 상피세포 배양을 위해 사용한 배지는 MEM (Minimum Essential Medium)에 10% 우태아 혈청 (fetal calf serum), 0.5% dimethyl sulfoxide, glutamine (0.292 g/l), epidermal growth factor (40 ug/ml), cholera toxin (30 ng/ml), hydrocortisone (2 ug/ml), insulin (40 ug/ml), transferin (5 ug/ml)을 첨가하였다. 세포의 성층화를 위해 사용한 배지는 MEM에 10% 우태아혈청, 0.5% dimethyl sulfoxide, glutamine (0.292 g/l)를 첨가하였다. 섬유모세포 배양을 위해 사용한 배지는 MEM에 10% 우태아 혈청을 첨가하였다. 배양에 사용한 용기는 24 well형 조직배양접시를 사용하였다.

### 2. 실험방법

채취한 조직편을 즉시 MEM에 넣어 실험실로 운반하였다. penicillin 100 IU/ml, streptomycin

100ug/ml, fungizone 2.5 ug/ml를 첨가한 MEM으로 3회 세척한 후 조직을 가위로 약  $0.1 \text{ cm}^2$  크기의 조직편으로 절단한 후 배양용기에 분주하였다. 배양용기에 분주한 후 약 48시간 동안 조직편이 모세관현상에 의하여 배양용기에 잘 부착될 수 있도록 적은 량의 배지만 공급하고 3일째부터는 2-3일 간격으로 배지의 량을 충분히 교환공급하였다. 상피세포 배양용 배지를 먼저 사용하였으며 상피세포가 증식되어 나오기 시작하여 방사상으로 퍼져나가면 상피세포 배양용 배지와 섬유모세포 배양용 배지를 2-3일 간격으로 교대로 사용하였으며, 3주째 동안은 세포의 성층화를 위한 배지만을 사용하였다. 배양기의 조건은 5%  $\text{CO}_2$ , 20%  $\text{O}_2$ ,  $37.4^\circ\text{C}$ 로 하였다. 3주후에는 0.3% dispase용액을 배양된 조직위에 넣고 배양기내에 60분동안 둔 후 바닥에서 조직을 유리시켜 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하였다.

## III. 결 과

### 1. 시험관내에서 조직의 증식상태

3일후 조직편의 변연부에서 상피세포가 증식되어 나오기 시작하여 증식속도가 가속화되어 4-5일 후에는 상피세포들이 조직편에서 방사상으로 퍼져나갔다 (사진 1). 섬유모세포 배양을 위한 배지를 사용한 후 약 2-3일 사이에 증식된 상피세포층위로 결합조직층이 조직편에서 증식되어 나오기 시작하여 퍼져나갔다 (사진 2). 상피세포층과 결합조직층이 방사상으로

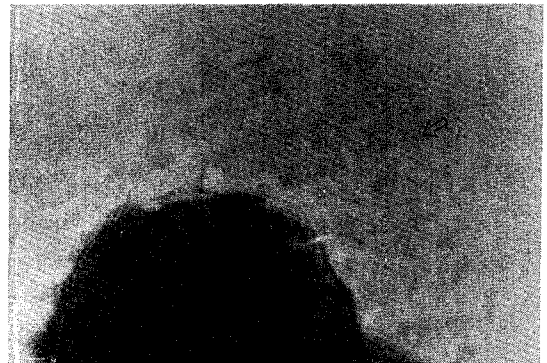


사진 1. 상피세포의 증식을 보여주는 전도 광학현미경 사진.  $\times 100$ 사진

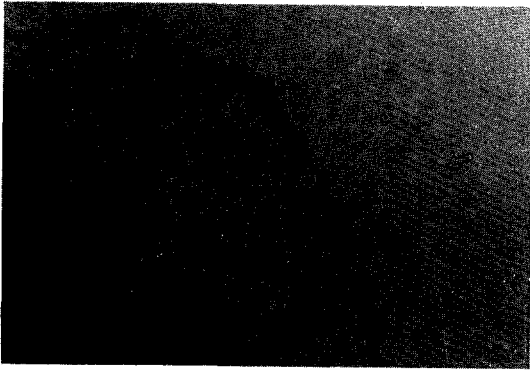


사진 2. 증식되어 나온 상피층과 결합조직층을 보여주는 전도 광학현미경 사진.  $\times 100$   
 ⌋ 상피세포층, ▲ 결합조직층

자라면서 인접한 조직면에서 자라나오는 세포들과 서로 연결되었다.

## 2. 증식된 조직의 광학 및 전자현미경 검사 소견

조직편을 수직으로 절단하여 광학현미경으로 관찰한 결과 상피층과 결합조직층에 성층현상이 이루어져 있었다 (사진 3). 상피층에는 3-6층의 세포층을 볼 수 있었고, 각화층은 없었으며, 각 층에서 핵은 명백하였다. 상피층 아래에는 소성 결합조직층을 관찰할 수 있었다. 전자현미경으로 관찰한 결과 상피세포층의 상층의 세포내에 microfilament를 표면가까이에서

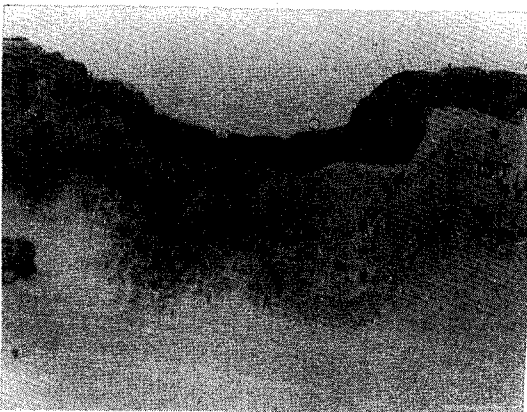


사진 3. 배양된 조직의 상피층과 결합조직층을 보여주는 광학현미경 사진.  $\times 200$   
 EP : 상피층, CT : 결합조직층

볼 수 있었고, 각 층마다 세포의 모양에 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며 (사진 4), 세포와 세포들은 서로 밀접하게 유착되어 있었으며, 세

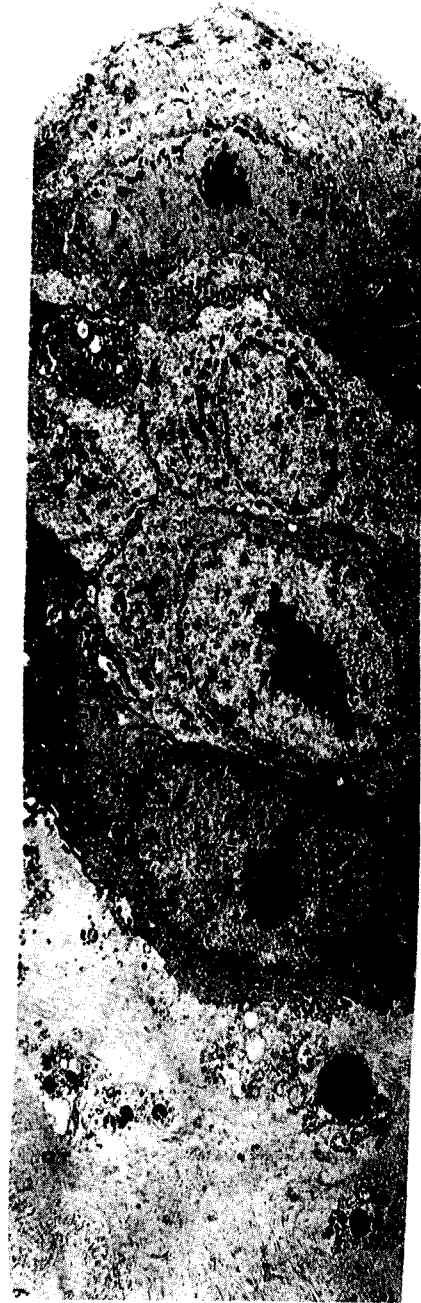


사진 4. 배양된 조직의 전자현미경 사진.  $\times 4000$

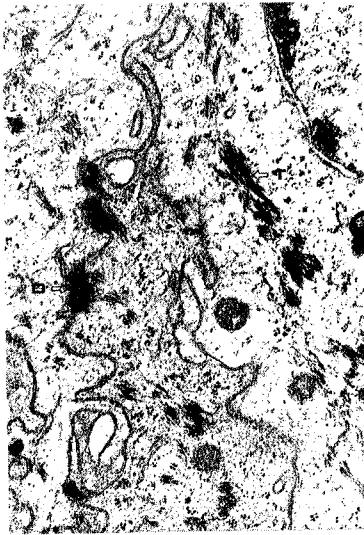


사진 5. 상피세포들의 연결부위를 보여주는 전자현미경사진.  $\times 15000$   
D : desmosome T : tonofibril

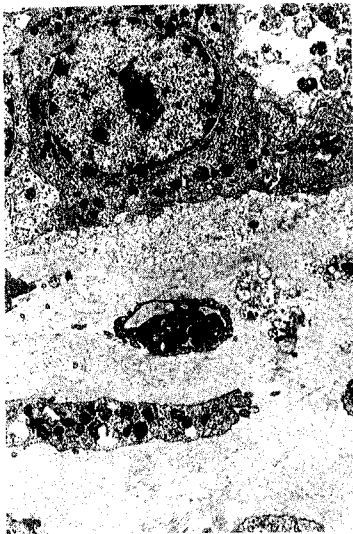


사진 6. 상피층과 결합조직층의 연결부위를 보여주는 전자현미경사진.  $\times 5000$

포연결부위에서 desmosome을 관찰할 수 있었고, 각 세포내에는 많은 tonofibril과 granule이 관찰되었다 (사진 5). 결합조직층과 연결되는 부위에는 hemidesmosome 이나 basement membrane이 없었다. 결합조직층에는 상피세포와 접하는 부위에 세망섬유 (reticular fiber)가

있었으며, 그 하방에 섬유모세포와 교원섬유 (collagen fiber)들이 있었다 (사진 6).

#### IV. 고 찰

점막을 배양하여 전층이식편의 재료로 사용하기 위하여 상피를 진피와 함께 시험관에서 자라게 하는 방법을 개발하는데 문제점은 진피가 상피의 증식을 억제한다는 점이다. 과거에는 진피에서 분비되는 인자가 상피의 성장과 분화를 증진시킨다고 생각되어 진피의 존재가 상피세포의 유지 및 증식을 위해 필수적인 것으로 생각되어 왔으나<sup>7)</sup> 건, 건막, 근막, 플라 스틱위에서도 상피세포가 잘 증식됨이 밝혀지면서 상피에 대한 진피의 역할은 진피고유의 것이 아님이 판명되었다<sup>4,5,8)</sup>.

그러나 생체의 배양시 진피가 상피의 증식을 억제하는 경향이 있어 많은 연구자들이 상피세포의 증식을 위해서 상피세포보다 훨씬 활발하게 증식하는 섬유모세포들을 제거하거나 섬유모세포의 증식을 억제시켜서 상피세포만 선택적으로 증식시킬 수 있는 방법을 개발하였다<sup>9,10,11)</sup>.

본 연구에서 저자는 먼저 상피세포를 선택적으로 증식시킬 수 있는 배지를 사용하여 상피세포를 먼저 증식시킨 다음 섬유모세포를 증식시키는 배지를 사용함으로써 증식된 상피세포층위에 섬유모세포를 증식시킬 수 있었으며 섬유모세포의 증식으로 인한 상피세포의 증식이 억제되는 것을 피할 수 있었다.

상피세포를 배양하는 방법으로는 Rheinwald와 Green<sup>9)</sup>에 의하여 소개된 방사선 조사한 3T3 섬유모세포층위에 상피세포들을 배양하는 방법, Bell<sup>6)</sup>과 Lillie<sup>12)</sup>에 의하여 소개된 콜라젠겔을 이용하는 방법, Southgate<sup>13)</sup>와 Arenholt-Bindlsev<sup>3)</sup>에 의하여 소개된 조직배양 (explant culture)방법이 있다. 본 연구에서는 결체조직층과 함께 상피세포를 배양하기 위하여 조직배양방법을 이용하였다. 이 방법은 이물인성(xenogenous) 성분인 3T3나 콜라젠겔을 사용하지 않고 배양하는 장점이 있다.

정상점막에서 상피와 진피의 경계부위에 he-

midesmosome을 가진 기저막 (basement membrane)이 존재하여 상피와 진피의 결합에 중요한 역할을 한다. Bell등은<sup>6)</sup> 섬유아세포를 배양한 후 콜라겐젤로 고정하여 진피에 해당하는 층을 만들어 그 위에 상피세포를 배양한 결과 hemidesmosome을 가진 기저막이 형성됨을 관찰하였다. 그러나 Lillie등은<sup>12)</sup> collagen fibrils위에 상피세포를 배양한 결과 hemidesmosome과 기저막이 형성되지 않았다고 보고하였다.

본 연구에서는 배양된 결합조직층과 상피층 사이에 hemidesmosome과 기저막이 형성되지 않았다. 상피층과 결합조직의 결합은 기저세포층에서 결합조직층으로 돌출된 세포질돌기 (cytoplasmic process)와 상피층과 접하는 결합조직층에 있는 세망섬유 (reticular fiber)에 의하여 서로 연결되어 있는 것으로 관찰되었으며 부분적으로 서로 분리된 부위도 관찰되었다. 이러한 관찰에서 배양된 점막에서 hemidesmosome과 기저막이 없어 상피와 결합조직층의 결합이 약하리라 생각된다. 앞으로 hemidesmosome을 가진 기저막을 상피와 결합조직 사이에 형성하는 구강점막의 배양방법에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

상피세포를 배양하면 단일세포층으로 증식해 나가기 때문에 성층형성을 유도하기 위해 지금까지 여러가지 방법이 사용되었다<sup>3,4,14)</sup>. 본 연구에서는 Arenholt-Bindslev<sup>3)</sup>가 사용한 방법에 따라 DMSO를 이용하였다. DMSO의 작용은 확실히 밝혀지지 않았지만 구강상피세포의 성장과 분화를 돕는 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 저자는 MEM에 0.5% DMSO를 첨가한 용액을 사용하여 3-6층으로 성층화된 상피세포층을 얻을 수 있었다. 각 세포층의 세포들은 분화가 잘 되어 있었으며 뚜렷한 핵을 가지고 있었다. 세포질에는 많은 과립과 필라멘트 다발을 관찰할 수 있었으며, 이들 필라멘트 다발들은 당김원 섬유 (tonofibril)을 형성하고 있었다. desmosome과 당김원 섬유는 모든 세포에서 흔히 관찰되었으며, 상층의 세포들은 표면가까이에 microfilament를 가지고 있었다. 기저부의 세포와 상부의 세포들은 형태학적

차이가 현저하지 않아 기저층, 가시층, 과립층으로 세포들을 구분할 수 없었으며, rete peg이나 각질층의 형성이 없었다. 앞으로 배양조건을 변화시켜 정상적인 구강점막과 구조적으로 더 동일한 점막으로 배양하는데 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

## 참고문헌

1. Umeda T : Experimental autotransplantation of full thickness skin into the mouth. *Oral Surg* 23 : 709, 1969.
2. Dellon AL, Tarpley TM, Chretien PB : Histologic evaluation of intraoral skin grafts and pedicle flaps in human. *J Oral Surg* 34 : 789, 1976.
3. Arenholt-Bindslev D, Jepsen A, MacCallum DK, Lillie JH : The growth and structure of human oral keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 88 : 314, 1987.
4. Lauer G, Otten JE, Specht BU, Schilli W : Cultured gingival epithelium - A possible suitable material for preprosthetic surgery. *J Cranio-Max-Fac Surg* 19 : 21, 1991.
5. 최병호, 박주영, 최성호, 고춘명, 이종영 : 치은상피의 배양에 관한 연구. *대한구강악안면외과학회지* 20, 201, 1994.
6. Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, et al : The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol* 81 : 2s, 1983.
7. Briggaman RA, Wheeler CE : Epidermal-dermal interaction in adult skin ; Role of dermis in epidermal maintenance. *J Invest Dermatol* 51 : 454, 1968.
8. Briggaman RA, Wheller CE : Epidermal-dermal interaction in adult human skin ; The nature of the dermal influence. *J Invest Dermatol* 56 : 18, 1971.
9. Rheinwald JG, Green H : Serial cultivation of strains of human keratinocytes :

- Formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 3131, 1975.
10. Price FM, Camalier RF, Gantt R, Taylor WG, et al : A new culture medium for human skin epithelial cells. *In Vitro* 21 : 147, 1980.
  11. Pittelkow MR, Scott RE : 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.
  12. Lillie J, MacCallum DK, Jepsen A : Growth of stratified squamous epithelium on reconstituted extracellular matrices : long-term culture. *J Invest Dermatol* 90 : 1100, 1988.
  13. Southgate J, Williams HK, Trejdosiewicz LK, Hodges GM : Primary culture of human oral epithelial cells. Growth requirements and expression of differentiated characteristics. *Lab Inv* 56 : 211, 1987.
  14. 박호철, 오수명, 주홍재, 박재경, 최용복 : 배양된 상피세포를 이용한 광범위한 화상의 치료와 피부재건에 관한 연구. *외과학회지* 37 : 135, 1989.