

## 가토모델에서 배양 구강상피를 이용한 근-점막 피판의 형성에 관한 연구

신영민<sup>1</sup> · 정현중<sup>2</sup> · 안강민<sup>1</sup> · 박희정<sup>1</sup> · 성미애<sup>1</sup> · 김성민<sup>3</sup> · 황순정<sup>1</sup> · 김명진<sup>1</sup> · 장정원<sup>4</sup> · 김성포<sup>5</sup> · 양은경<sup>5</sup> · 송계영<sup>6</sup> · 이종호<sup>1</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실 및 치의학연구소, <sup>2</sup>건국대학교 의과대학 소아과학교실

<sup>3</sup>강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, <sup>4</sup>연세대학교 의과대학 약리학교실

<sup>5</sup>(주)바이오랜드 생명공학연구소, <sup>6</sup>중앙대학교 의과대학 병리학교실

### Abstract

#### FABRICATION OF MYOMUCOSAL FLAP USING CULTURED ORAL EPITHELIUM IN RABBIT MODEL

Young-Min Shin<sup>1</sup>, Hun-Jong Chung<sup>1</sup>, Kang-Min Ahn<sup>1</sup>, Hee-Jung Park<sup>1</sup>, Mi-Ae Sung<sup>1</sup>, Soung-Min Kim<sup>3</sup>,  
Soon-Jung Hwang<sup>1</sup>, Myung-Jin Kim<sup>1</sup>, Jeong-Won Jahng<sup>4</sup>, Sung-Po Kim<sup>5</sup>,  
Eun-Kyung Yang<sup>5</sup>, Kye-Yong Song<sup>6</sup>, Jong-Ho Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dentistry,  
Seoul National University & Dental Research Institute

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

<sup>3</sup>Department of Oral and Maxillofacial surgery, School of Dentistry, Kangnung National University

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, Yonsei Medical University

<sup>5</sup>Bioland R&D center, <sup>6</sup>Department of Pathology, Medical School, Chungang University

**Purpose** : Extensive defect of oral and maxillofacial area is usually reconstructed with composite flap including skin paddle. However, if the defects are lined with only skin components, the mucosa's role in mastication and texture are not restored. Furthermore, stiffness and hair-growing prevent denture rehabilitation and good oral hygiene. This study was performed to overcome the disadvantages of composite soft tissue flaps including the skin and to make a model for myo-mucosal flaps.

**Materials and methods** : Buccal mucosa sized 0.5×1.0 cm<sup>2</sup> from New Zealand rabbit (around 1.5kg) was harvested and cultivated by the modification of Rheinwald and Green's keratinocyte culture method. Cultured mucosa was grafted on the fascia of latissimus dorsi as form of mucosal sheet. After 7, 10, 14 days, the myomucosal flap was excised and evaluated under light microscope with H & E and immunohistochemical staining. As control group, harvested buccal mucosa from rabbit was transplanted to gracilis muscle(n=6).

**Results** : From 7 days after prelamination, the basal layer of the grafted mucosa resembled that of normal mucosa. As control group, transplanted mucosa had original shape but there's slight inflammatory reaction. Prelaminated mucosa has 19.8±4.59 cell layers and some samples have more than 20 layers. The expression rate of PCNA was relatively strong (42.9%±14.1) at the basal layer of grafted mucosa and the laminin was found at the basal layer. On the contrary, prelaminated mucosa at 10 days showed moderate expression rate of PCNA(32.4%± 4.62). We found the mucosal layer was somehow disappeared and there is strong inflammatory reaction. After 14 days prelamination, the grafted oral keratinocytes were almost disappeared and expression of PCNA was not observed.

**Conclusion** : We can make 75 fold large mucosal(3850mm<sup>2</sup>) sheet from small samples of mucosa (50mm<sup>2</sup>). Epithelial sheet that grafted on the fascia of muscle underwent differentiation and proliferation. But after 10, 14 days, there was strong inflammatory reaction and the grafted mucosa was destroyed from surface layer. In rabbit model, transfer of fascio-mucosal flap should be done from 7 to 10 days after prelamination.

**Key words** : Myo-mucosal flap, Cultured mucosa, Oral keratinocyte, Tissue-engineering, Prelamination, Rabbit model

※ 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥 사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : 03-PJ1-PG3-20500-0025).

## I. 서 론

구강악안면외과 임상에서 소규모의 구강점막 결손 시 인접 점막조직을 결손부위로 이동시켜 직접 봉합하거나 협점막이나 구개점막 이식을 이용하고 있다<sup>1,2)</sup>. 그러나 선천적 혹은 외상이나 종양 절제 등의 후천적 원인에 의한 광범위한 점막 결손의 경우 채취할 수 있는 가용 점막에 한계가 있고 또 이식 성공을 위해 혈류화 조직 이식이 필요하기 때문에 대개가 피부를 포함하는 유경 또는 유리 피판술로 결손부를 재건하고 있다<sup>3-5)</sup>. 이와 같은 경우에는 점막이 아닌 피부를 이용하므로 술후 주위조직과 부조화가 발생하고 피부부속기 및 각화로 구강내에 잘 생착되어도 불편감이 있으며, 피판 공여부 수술에 의한 또 다른 공여부 결손과 반흔 등의 후유증이 남게 된다<sup>4,6,7)</sup>. 이러한 피부 이식에 따른 문제점을 보완코자 위나 소장 일부의 mesenteric vessel에 기초하여 구강내로 이식하는 방법도 도입 되었으나, 점액의 분비와 같은 장점에도 불구하고 구강 결손부 형태를 부여하기 어렵고 또한 채취를 위해 일반외과 수술팀이 필요한 점 등의 불편감으로 인해 보편화되지 못하였다<sup>8)</sup>.

1997년 Rath 등<sup>9)</sup>은 구강연조직 결손 시 가장 많이 사용되고 있는 유리전완피판에서 피부 대신 점막을 옮기고 또 피부 결손을 막기 위해 자가 구강 점막을 스템프 이식 형태로 전완피판 하방에 미리 위치 시켜 생착 시킨 후 조직판을 거상하는 prelaminated fasciomucosal radial forearm flap 형성법을 발표하였으며, 그후 meshed mucosal graft를 이용하는 방법과 신경과 점막을 동시에 prelamination 시킨 neuromucosal prelaminated flap도 보고하였다<sup>10)</sup>. 이 방법들은 당시 시도되고 있던 부분층피부이식을 이용한 전판상화 대신 점막이 필요로 되는 구강이나 비강 등에 사용될 수 있는 독특한 방법이기도 하였지만, 구강내에서 자가 점막을 채취하는 데는 한계가 있다는 점이 지적되었다. 2001년 Lauer 등<sup>7)</sup>은 이러한 가용 점막 양의 한계점을 극복하고자 구강 점막을 조직공학적으로 배양하여 단세포층의 구강각화상피세포 박막을 형성하고 이것을 전완 근막 상방에 prelamination 시키는 진보된 방법을 임상에 적용하였다. 2003년 Schultze-Mosgau 등<sup>11)</sup>도 백서에서 pre-confluent monolayer로 배양된 구강각화 상피를 근육에 prelamination시키는 연구를 시행하였다. 이와 같이 임상 및 동물에서 구강각화상피세포를 이용하여 전판상화 점막판을 만드는 연구가 진행되었으나 이들에서의 문제점은 세포단층의 점막세포를 넣어 판상화 한 것으로, 실제 구강 점막이 외력에 견디기 위해서는 단층 보다는 중층화된, 보다 정상 구강점막에 가깝게 분화된 점막세포층을 이용하는 것이 바람직 하다. 또한 prelamination 동물 모델은 실제 전판상화된 조직판을 유경 또는 미세이전을 통해 구강내 결손부로부터 이식이 가능하여야 하는데, 백서 모델은 이러한 점에서

수술적 제한이 있다.

본 연구에서는 이제까지의 단층 구강점막세포를 이용한 전판상화의 단점을 보완하고 수술적 조작성이 용이하도록 중층화된 각화상피세포를 이용한 전판상화(prelaminated) 점막근조직판 가토 모델을 형성코자 하였다.

## II. 재료 및 방법

실험개체는 체내 전판상화 기간에 따라 총 3군(7일, 10일, 14일)으로 분류하며, 대조군으로는 위의 실험에 사용된 가토의 구강점막을 채취하여 가토의 박근(gracilis)에 이식하여 7일, 14일로 분류하여 실험하였다(n=6).

### 1. 점막 채취 및 구강각화세포의 중층 배양

2.5kg 내외의 New Zealand rabbit(n=18)을 Ketamine hydrochloride (Ketara<sup>®</sup>, 50mg/ml, Yu-Han Corp., Korea)와 Xylazine (Rompun<sup>®</sup>, 20mg/ml, Bayer Korea Ltd., Korea)을 4:1로 혼합하여 귀정맥으로 정맥마취를 시행하였다(초기 용량 0.5ml/kg, 추가 용량 0.25 ml/kg). 10% 베타딘 (Potadine, Sam-II pharm. Korea)으로 구강내 소독을 시행한 후 좌측 협점막 부위에 1:100,000 에피네프린을 함유한 2% 리도케인(Lidocaine HCl Inj. Huons, Korea)으로 침윤마취를 하고 협점막을 1.0cm×0.5cm 크기로 채취하였다. 점막 공여부는 5-0 흡수성 봉합사(SurgiSorb<sup>®</sup>, Samyang Co., Korea)로 직접 봉합하였다. 채취된 협점막을 PBS(10ml, Gibco, USA)로 세척 후 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)에 보존하여 clean bench로 바로 운반하였다. 채취된 점막은 70% 알코올에 30초간 담구어 소독한 후 PBS로 수 차례 추가로 세척하였다.

세척한 점막을 배양용기(90mm culture dish)에 옮겨 점막층과 피하조직 및 근조직을 미세가위로 분리하였다. 분리된 조직을 PBS로 다시 세척한 후 Dispase II (1mg/ml, Boehringer Mannheim, Germany)로 처리하고(4℃, 14~16시간), PBS로 조직을 세척한 다음 멸균된 미세접사를 이용하여 진피와 표피를 분리하였다. 표피만을 택하여 약 0.5mm<sup>2</sup>의 크기로 잘게 자르고, 0.05% 트립신-0.02% EDTA(Gibco, USA)로 37℃ 에서 5분간 항은 배양하였다. 10% FBS (Fetal Bovine Serum, JRH, USA)를 포함한 DMEM 용액으로 트립신-EDTA를 비활성화 시켰으며, 1,800rpm에서 5분간 원심분리하였다. 튜브 하방에 침전된 세포 펠렛(pellet)을 10% FBS를 함유한 DMEM용액에 30분간 다시 부유시키고 70um 나일론 세포 여과기(Falkon, Beckton Dickinson, USA)에 여과시킨 후 다시 5분간 1,800rpm에서 원심분리하였다. 모여진 세포는 1ml

의 배양액에 부유시킨 후 헤모사이토미터(hemocytometer, CASY-1, Schärfe system, Germany)로 세포의 수를 산정하였다. 배양액은 DMEM과 Ham's F-12 (Ham's F-12 Nutrient mixture, Gibco, USA)를 3:1의 비율로 혼합한 용액에 100 U/ml 페니실린 (Penicillin, Gibco, USA), 100µg/ml 스트렙토마이신 (Streptomycin, Gibco, USA), 0.4µg/ml 하이드로코티존 (Hydrocortisone, Sigma-Aldrich Co., USA), 5µg/ml 트랜스페린 (Transferrin, Sigma-Aldrich Co., USA), 10ng/ml 상피성장인자 (Epidermal Growth Factor, Sigma-Aldrich Co., USA), 10<sup>-10</sup> M 콜레라 독소 (Cholera Toxin, Sigma-Aldrich Co., USA), 2×10<sup>-11</sup> M 트리요오도타이로닌 (Triiodothyronin, Sigma-Aldrich Co., USA), 5µg/ml 인슐린(Insulin, Sigma-Aldrich Co., USA)을 배합하여 만들었다.

추출된 구강점막각화세포는 섬유아세포를 마이토마이신-C (Mitomycin-C, Sigma-Aldrich, USA)로 처리하여 feeder layer를 만들어 놓은 90mm 배양접시에 1cm<sup>2</sup>당 1×10<sup>4</sup>개의 밀도로 접종하였다<sup>12)</sup>. 접종 4일 후 배양액을 바꾸고 부착되지 않은 각화세포는 과기하였다. 그 후 배지를 매일 교환하였으며 구강각화세포가 5~6층으로 중층화되면 각화세포를 feeder layer와 분리하여 전판상화 실험에 이용하였다.

배양접시의 feeder layer 형성은 다음과 같이 시행하였다. 스위스 백색 쥐 (Swiss albino mouse - American Type culture Collection No. CCL 92)의 섬유아세포에서 분리된 3T3 섬유아세포를 5% 이산화탄소와 95% 산소 혼합 환경에서 DMEM과 10% FBS를 첨가한 배지에서 배양하였으며, 세포가 배양접시 바닥에 confluent해지면 세포분열을 억제하기 위해 4µg/ml 농도의 마이토마이신-C로 90분간 처리하였다. 그후 PBS로 세척하여 마이토마이신을 제

거하고 트립신을 이용하여 분열억제된 3T3 섬유아세포를 2×10<sup>4</sup>개의 농도로 배양접시에 접종하였다.

## 2. 자가 배양 점막의 가토에서의 전판상화

협점막을 채취 배양한 21일째에 점막을 제공한 동일한 토끼를 전술한 방법대로 마취 시행 후 견갑골 침부에서 전방장골 능을 연결하는 선상까지 삭모 소독 후 1:100,000 에피네프린을 함유한 2% 리도케인으로 국소마취를 시행하였다. 10번 수술도를 이용하여 피부 및 막층(panniculus carnosus) 절개 후 광배근을 확인하고 근육 상방의 투명의 지방층을 제거하였다. 중층으로 배양된 점막세포를 육안으로 확인한 1.5×1.5cm 크기의 실라스틱 박판(silicone sheet, United Silicone, USA)을 이용하여 1×1cm의 배양점막세포를 디쉬에서 떼어낸 후, 배양된 구강점막을 근육층으로 실라스틱 박판은 피부층으로 위치시키고 실라스틱 박판을 근육층에 5-0 흡수성봉합사로 고정하였다. 좌측과 동일한 방법으로 우측 협점막을 0.5×1cm 크기로 채취하고 알콜과 PBS로 잘 세척하였다. 채취된 점막의 피하지방층을 가위로 잘 제거하여 최대한 이식체를 얇게 한 다음 박근을 노출시키고 근육 상방에 점막과 실라스틱 박판을 동일한 형태로 고정하여 대조군으로 삼았다.(Fig. 1)<sup>13)</sup>

## 3. 전판상화 점막근조직판의 생존 및 분화 관찰

전판상화수술 후 7, 10 및 14일째에 각기 6마리의 가토를 전술한 방법으로 정맥마취 시행한 후 이식부를 절개하여 실라스틱 박판을 제거하였다. 배양 점막과 광배근의 생착 여부를 육안으로 확인한 후 생착되지 않은 실험체료는 실패로 간주하였다. 이식된 배양 점막과 광배근을 같이 절제하여 시편 채취 후 동물을 희생시켰다. 시편을 10% 포르말린

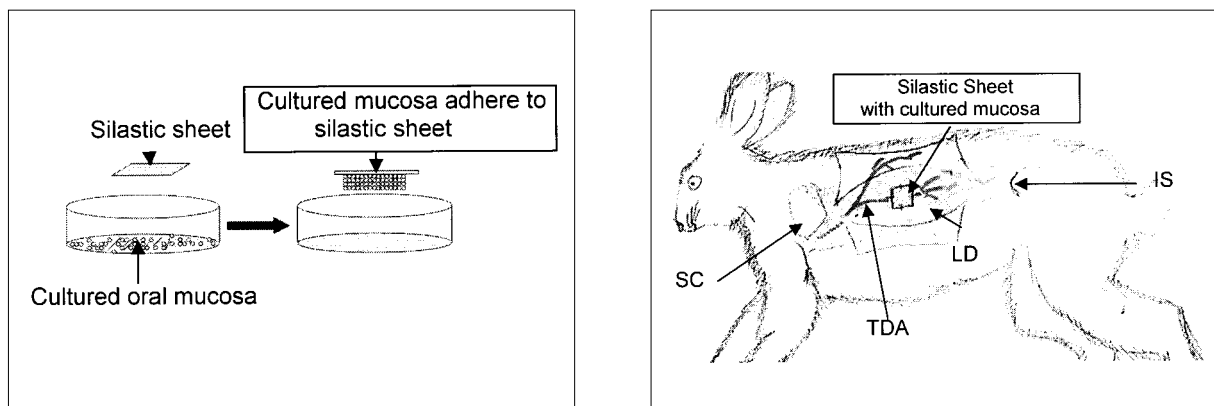


Fig. 1. Schematic Drawing of Prelamination procedure

SC: Scapula, TDA: Thoracodorsal Artery, IS: Iliac spine LD: Latissimus Dorsi

용액에 12시간 고정 한 후, 에탄올로 순차적으로 탈수한 다음 xylene으로 대체시켜서 조직을 투명하게 하고, 파라핀 포매 블록을 만들었다. 5 mm 두께의 절편을 형성하고 헤마톡시린-에오진으로 염색한 다음 광학현미경으로 점막세포와 근육층 및 계면의 상태 그리고 200배의 배율로 기저층의 형태 및 점막 세포층의 수를 관찰하였다. 세포층의 수는 40 배 배율의 광학 현미경 상에서 대표적인 점막 부분을 찾은 후 200배 배율의 디지털 영상을 얻어 수직 격자(그리드)를 그려 시야에서 3개의 격자를 임의로 추출하여 격자 내의 세포 수를 셀 후 기저층에 위치한 세포의 수로 나누어 세포층을 계산하였다<sup>14</sup>.

기저층의 세포 분열능과 라미닌 침착 여부, 구강 점막세포의 특성유지 여부 및 미세혈관 형성 정도를 면역조직화학염색을 통해 시행하였다. 아비딘-비오틴-과산화효소 복합체 (Avidin-Biotin-Peroxidase Complex, DAKO LSAB kit, DAKO, USA)에 항원 결정기를 부착시키는 방법을 이용하여 증식세포핵 항원 (PCNA, DAKO, USA), 라미닌 (laminin IMM7-7, Sigma, USA), 사이토케라틴 13/14 (cytokeratin 13/14 - mouse monoclonal, American Res Products Inc., USA)와 Factor VIII(DAKO-vWF, DAKO, USA)으로 염색하였다.

증식세포핵 항원은 증식이 활발한 세포에서 발현되며 기저세포의 세포증식능을 관찰하기 위하여 사용하였다. 슬라이드에서 대표적인 부위를 200배 배율로 관찰하고 수직적으로 9개의 그리드를 설정하고 임의로 3개의 그리드를 선택하여 PCNA에 염색된 세포 개수를 세어 전체 기저층 세포의 수로 나누어 발현율을 계산하였다<sup>14,15</sup>. 라미닌과 사이토케라틴은 침착유무를 관찰하였다. 혈관 형성을 관찰하기 위해, Factor VIII으로 염색된 슬라이드를 일차적으로 40배의 배율을 통해 우선적으로 가장 많은 수의 미세혈관이 보이는 부위를 설정한 후 200배의 배율로 미세혈관의 수를 세었다.

#### 4. 전자현미경관찰

가토의 배양 점막세포와 정상 점막세포의 초미세 구조를 비교하기 위해 투과전자현미경으로 관찰하였다. 가토의 헵점막에서 점막을 일부 채취하고(n=2), 중층화 배양된 점막에서 1×1cm<sup>2</sup>으로 시편을 분리하여(n=2) pH7.4의 0.1M cacodylate buffer에 포함된 2.5% glutaraldehyde에 두어 고정했다. 고정된 시편은 PBS로 15분간 3회 세척한 후 1M cacodylate buffer에 포함된 1% osmium tetroxide에 2시간 동안 추가고정하고 0.1M cacodylate buffer로 5분간 2번 세척한 뒤 에탄올을 이용하여 탈수했다. 탈수된 시편은 에폭시 레진(Epoxy Resin, Agar 100, Agar Scientific Ltd., UK)으로 침투시킨 뒤 박질편을 만들어 톨루이딘 블루로 염색하여 광학현미경으로 관찰 후 구강각화상피가 있는 부위를 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead acetate로 염색한 뒤 투과전자현미경 (JEOL 1010®, Japan)으로 관찰하였다.

#### 5. 생착율과 Cinamon's score 계산

이식된 구강점막각화 세포의 광배근 생착 여부는 전판상화 7, 10, 14일 경과 후, 이식된 부위를 채취하여 육안 및 현미경에서 관찰하며 3항목의 육안 관찰 항목(부착성, 색깔, 표면질감)과 3항목의 현미경 관찰항목(구조 무결성, 백혈구침윤, 부착성)을 종합하여 Cinamon's score를 계산하였다. 성공적인 이식의 기준은 구강상피세포가 일정하고 연속적인 층을 형성하는 것이며 광학 현미경으로 관찰하며 이식층 중앙을 수직으로 절제하여 평가하였다.(Table 1)<sup>16</sup>

#### 6. 통계

이식 전 배양 세포군과 3군의 실험군에 대하여 세포층의

**Table 1.** Evaluation of Graft take (Cinamon et al., 1993)

Macroscopic Score	0	1	2
Adherence	separated from wound	loosely adherent	tightly adherent
Color	blackened	mat gray or brown	normal
Pliability	very rough	minimally hardened	pliable and smooth
Microscopic Score	0	2	4
Structural integrity	destroyed	partially destroyed	maintained
Leukocyte infiltration	intense and/or in material	similar to control wound	not observed
Adherence	separated from wound	loosely adherent	tightly adherent

변화 과정과 3군의 실험군에서 PCNA의 발현을, 미세혈관의 개수 및 시나몬의 점수에 관하여 Kruskal-Wallis법을 시행하고 Dunn's multiple comparison을 이용하여 검증하였고 p값이 0.05 이하이면 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다(SPSS V11, SPSS Inc., Korea).

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 점막 세포의 배양과 중층화된 판상 점막의 형성

배양 7일 후 단층의 각화세포층이 생성되었으며 14일 후 중층화가 관찰되었다. 21일 경과 후에 5~8층으로 중층화

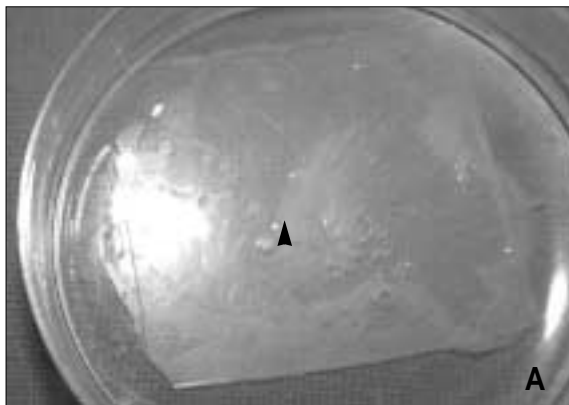
된 각화세포가 생성되었다 (평균:  $6.5 \pm 1.05$ 층)(Fig. 2). 중층화된 각화세포는 실라스틱 박판에 좋은 점착성을 보여 근막으로 이식할 수 있었다 (Fig. 3).

#### 2. 전판상화 근-점막 피판의 형성 및 육안적 관찰

7일 경과 후 실라스틱 박판을 제거한 후 근막 위에 형성된 불투명 판상의 조직이 관찰되었으며 일부 개체에서 주변 조직으로 염증을 시사하는 발적 현상이 보였다(Fig. 4). 10일과 14일 경과 후 실라스틱 박판을 제거 하고 봤을 때 일부 개체(10일 경과군 : 4개체, 14일 경과군 4개체)에서 판상 조직이 보이지 않았고 심한 발적이 있었다.



**Fig. 2.** Cultured oral mucosa (stratified mucosal keratinocyte)  
A: Keratinocyte culture for 3 weeks in culture dish, stratified keratinocyte was observed (phase contrast, x200).  
B: After 3 weeks culturing, 5~8 epithelial cell with tall columnar to flattened shape layer was observed.(H&E, x400).



**Fig. 3.** Cultured oral epithelium and intraoperative photography of prelamination surgery  
A: Cultured rabbit oral epithelium is attached to silastic sheet. White-patch like appearance is cultured rabbit oral mucosa(arrowhead)  
B: Silastic sheet with cultured oral keratinocyte was located on the latissimus dorsi muscle over thoracodorsal artery. To avoid graft mobility, two horizontal mattress suture was done between sheet and muscle.



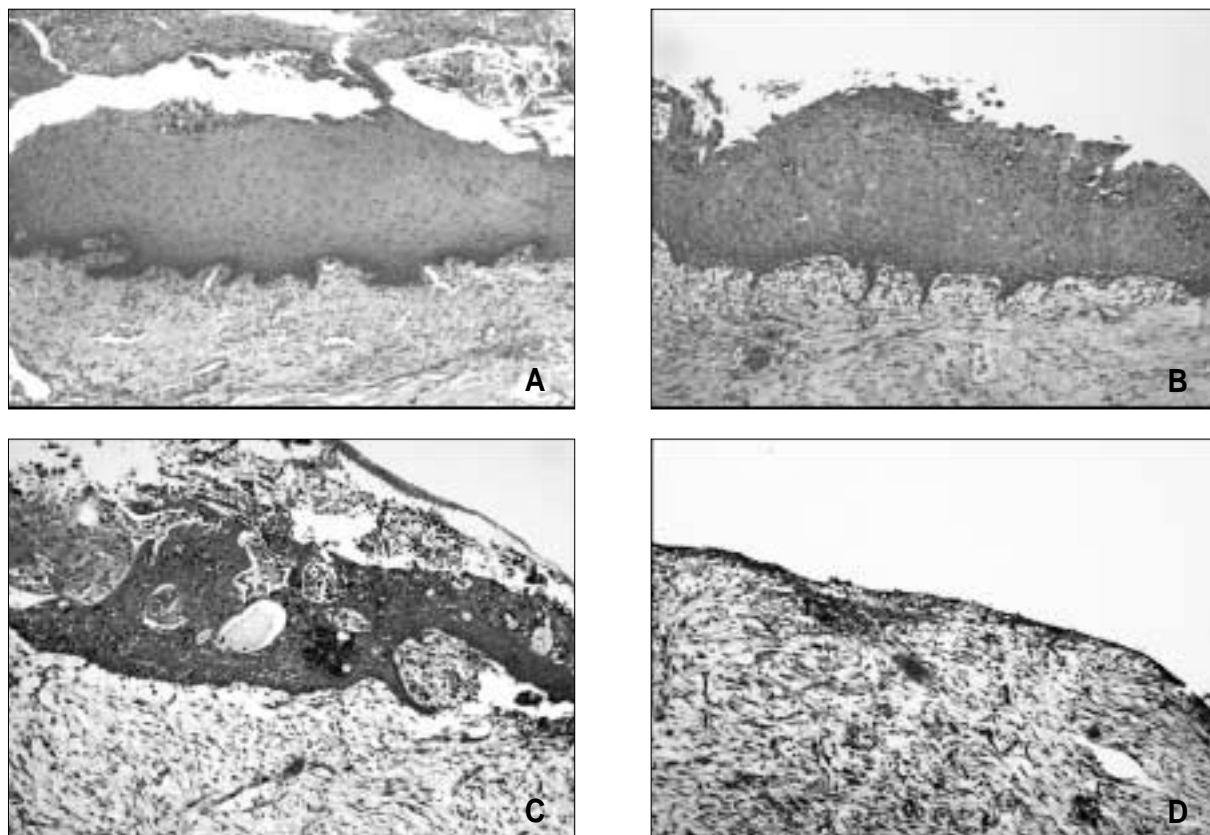
**Fig. 4.** Prelaminated myo-mucosal flap (after 7days silastic sheet was removed)  
Note yellowish white-patch appearance at the grafted site. Cultured oral keratinocyte was well taken and was not peeled off easily.

### 3. 전판상화 된 시기에 따른 세포층과 형태 변화

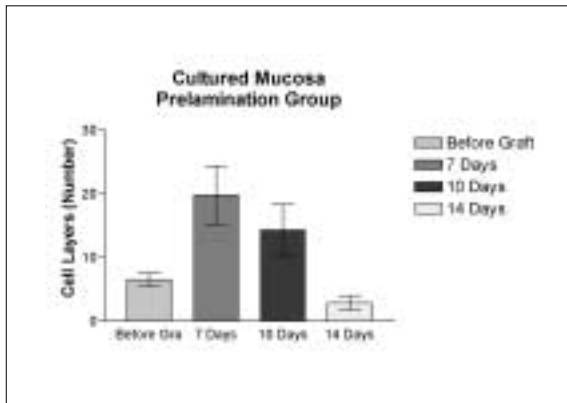
#### 1) 세포층의 변화

이식 전 배양점막은  $6.5 \pm 1.05$ 층 이었으며, 전판상화 후 시간에 따라 7일 후  $19.8 \pm 4.59$ 층으로 증가 하였고 10일 경과 후는  $14.3 \pm 4.01$ 층이었다(Graph 1, Fig. 5). 일부 실험군에서(n=4) 염증세포에 의한 점막의 파괴현상이 관찰되었고 14일 경과 후, 평균  $2.83 \pm 1.15$ 층으로 줄어들었으며 7일 경과 군과 14일 경과 군사이에 통계적 유의성이 관찰되었다 ( $p=0.001$ ).

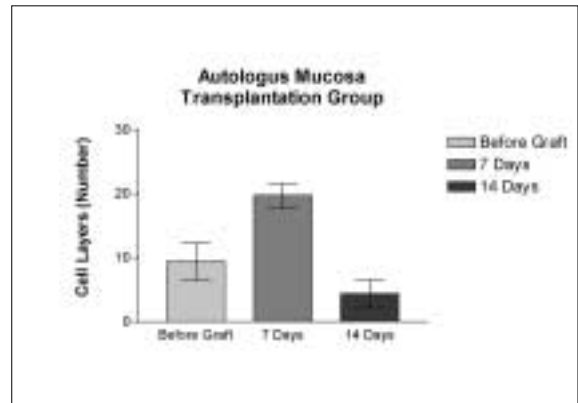
세포의 형태는 7일 경과 후 기저 층에서는 장방형 원주 세포가 관찰되었으며 표피층으로 갈수록 세포가 편평화 되었다. 그러나 14일 경과 후 관찰된 세포는 장방형 원주 세포는 관찰되지 않았으며, 세포의 응집현상이 발생하였고 편평화된 점막 상피 세포나 이식되었던 세포는 관찰할 수 없었고 일부 남아있는 세포에서도 이식된 점막세포의 파괴 현상이 관찰되었다.



**Fig. 5.** Prelaminated autologous mucosa and cultured mucosa (H&E, X100)  
A: Prelaminated autologous mucosa. Well defined rete ridge and well differentiated epithelial lining could be seen (7days later)  
B: After 7 days, the prelaminated cultured mucosa proliferated, rete-ridge like appearance was shown. The number of cell layer was increased by 3 times compared with cultured keratinocyte before prelamination.  
C: After 10 days, prelaminated cultured mucosa, inflammatory reaction was observed.  
D: After 14 days, mucosal layer was almost disappeared and inflammatory cell was infiltrated. (arrow: remaining epithelial remnant)



**Graph 1.** Cell layers of cultured mucosa prelamination group.



**Graph 2.** Cell layers of autologous mucosa transplantation group.

대조군으로 사용된 정상 점막에서 세포는 이식 전  $9.41+2.93$ 층이었고 이식 7일 후  $19.7+3.21$ 층으로 증가하였으나 이식 14일 후  $4.33+3.78$ 층으로 감소되었다. 이식 7일 후에 배양된 점막 세포와 비슷한 양상으로 기저부에서 장방향 원주 세포가 관찰되었고 표피로 올라 갈수록 편평화된 상피세포가 관찰되었다(Graph 2). 그러나 14일 경과 후 관찰된 세포의 형태는 기저부 세포나 상방 세포는 모두 편평화 되었으며 핵의 크기는 이식 전에 비하여 매우 작아지고 상피층과 결합조직의 분리가 관찰되었다.

대조군에서 육안으로 7일 경과군과 14일 경과군에서 이식된 자가 점막에서 모두 캡슐화 되었으며 광학현미경 하에서 림프구의 침윤이 관찰되었다.

### 2) 세포의 분열능

이식 7일 경과 후 관찰된 PCNA는 기저층에서  $42.9+14.1\%$ 가 발현되었으며 10일 경과하였을 때  $32.4\pm 4.62\%$ 가 발현 되었으나 14일 경과 후 PCNA는 발현되지 않았으며 각 군 사이에 통계적인 유의성( $p=0.0175$ )이 있었다(Fig. 6).

### 3) 라미닌 침착

배양 점막 7일 군에서 기저 세포층에 라미닌의 침착이 관찰되었으나, 10일과 14일 군에서 라미닌의 침착을 관찰할 수 없었으며 하방 근육으로 침투현상은 관찰되지 않았다(Fig. 7).

### 4) 구강 점막 세포의 점막 특성의 유지

관찰된 시편에서 이식된 기간에 상관 없이 사이토케라틴의 발현이 관찰되었으며 특히 사이토케라틴 13은 장방형의 원주세포 형태를 보이는 세포층에 발현되는 것이 관찰되었으며 사이토 케라틴 14는 이식된 점막 층 전반에 걸쳐 염색되는 것이 관찰되었다(Fig. 8).

### 5) 미세혈관의 개수

7일 경과한 군에서는  $5.28+1.80$ 개가 관찰되었으며 10일 경과한 군에서는  $7.14+3.23$ 개가 관찰되었다. 14일 경과 군에서는  $6.28+4.46$ 개가 관찰되었으며 통계학적인 유의성은 없었다 ( $p>0.05$ ).

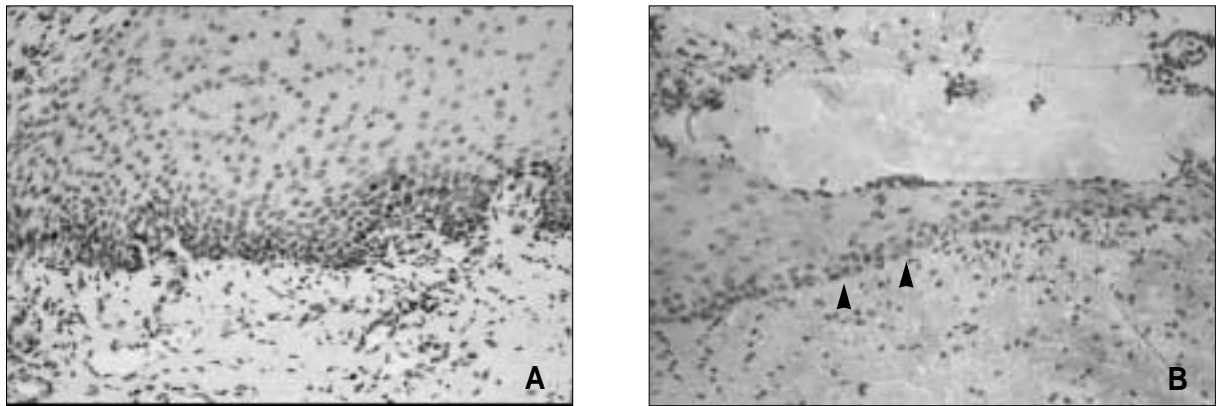
## 4. 투과전자현미경 (TEM)

관찰된 정상 가토의 점막 세포는 핵이 큰 원주형의 세포와 핵이 작고 납작해진 세포까지 여러 형태가 관찰되었다. 정상 가토의 표피쪽의 점막 세포는 미세융모모양의 세포가 하방으로 향하며 상방으로 미세한 썬기 모양이 관찰되었다. 배양된 점막세포는 미세 융모의 형태는 관찰되었으나 정상 점막 세포에 비하여 발달이 잘 되지 못하였으며, 대부분 핵의 크기가 크고 세포질이 적은 모양을 나타내었다. 각각의 세포들은 많은 미세 융모들로 결합되었으며 세포간 밀집도는 떨어지지만 세포간 데스모솜(desmosome) 결합이 관찰되었다(Fig. 9).

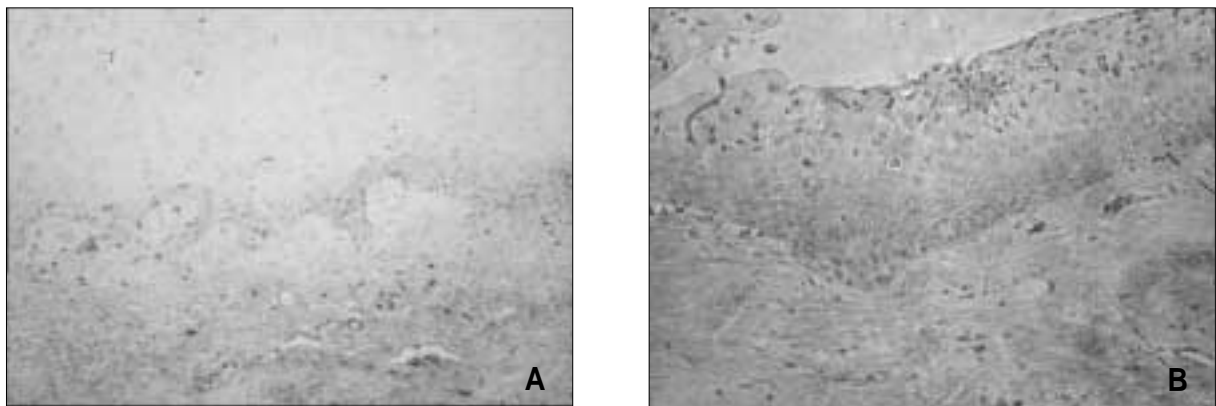
## 5. 생착율과 시나몬 점수

이식 7일 후 관찰한 배양 이식 점막 군에서 시나몬 점수는  $10.5+2.07$ 점이나 10일 경과 후의 시나몬의 점수는  $2.16+3.48$ 점이었으며 14일이 경과 하였을 때 시나몬의 점수는  $1.16\pm 1.83$ 점이었다. 모든 경우에서 배농이나 조직액(Seroma)이 차는 현상은 발견되지 않았다.

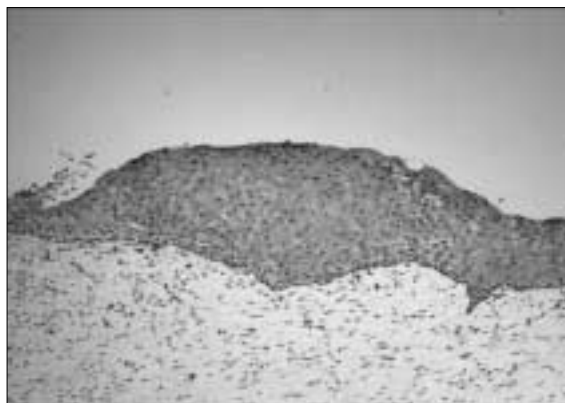
생착율은 7일 동안 전판상화 시킨 군에서는 100%의 생착율을 보였으나 10일 및 14일 경과 군에서는 33.3% (10일 경과군 = 2/6, 14일 경과군 = 2/6)의 생착율을 보였다 (Table 2).



**Fig. 6.** Prelaminated cultured mucosa (7days, X200, PCNA)  
A: Autologous mucosa graft. (control)  
B: At basal cell layer brown pigmented nuclei was observed. (arrows)



**Fig. 7.** Prelaminated cultured mucosa (7days) , Basal cell layer stained by Laminin (X200, Laminin)  
A: Autologous mucosa graft. Laminin was seen at basal layer and remaining dermal tissue.  
B: Cultured mucosa graft group. Laminin was seen at basal layer, but laminin was not penetrated underlying muscle.



**Fig. 8.** Prelaminated cultured mucosa (7days, CK-14)  
prelaminated mucosa was stained by CK-14. X100,  
CK14 (brown colored)



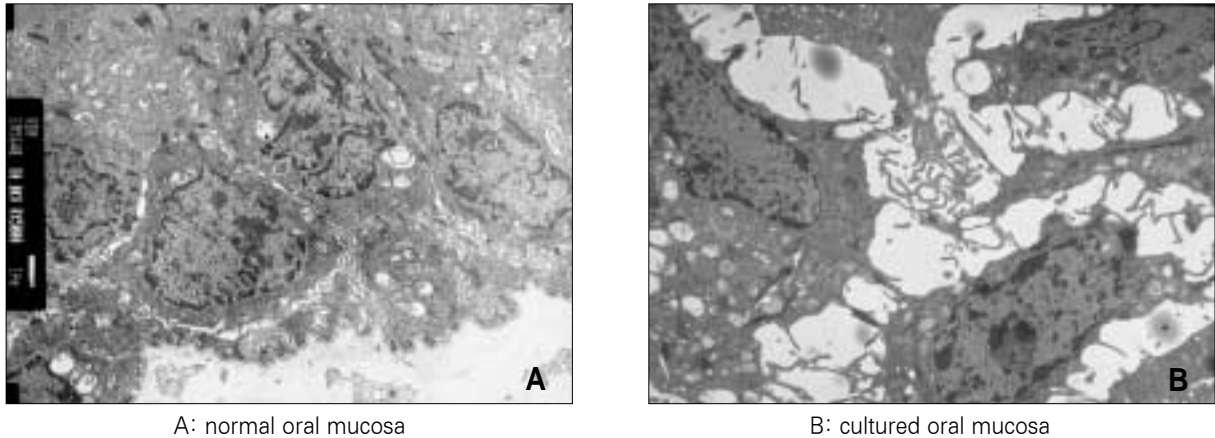


Fig. 9. TEM comparison between normal rabbit buccal mucosa and cultured mucosa , X5000.

Table 2. Change of Cultured Keratinocyte after Prelamination

	7 d.	10 d.	14 d.
Cell Layer	19.8±4.59	14.3±4.01	2.83±1.15
PCNA	++	+	-
Laminin	+	-	-
CK13	+	+	-
CK14	+	-	-
Cinamon's Score	10.5±2.07	2.16±3.48	1.16±1.83
GTR	100%	33.30%	33.30%

PCNA : Rate of positivity; +++ , >50% ; 10% < ++ < 50 %; + , < 10% ; - . No expression  
 Laminin, CK13, CK14 : + , expressed ; - , unexpressed. GTR means graft take rate

#### Ⅳ. 고 찰

구강점막 결손 시 이상적인 수복은 자가 점막 이식을 통한 수복이지만 점막의 결손부가 광범위 할 때에는 직접 이식이 불가능 하다. 따라서, 본 연구에서는 점막조직배양 기법을 이용하여 점막의 면적을 넓히고 증충화 배양을 통하여 이식에 사용될 수 있는 점막조직을 형성하였다. 각화세포의 배양은 Rheinwald와 Green<sup>17)</sup>이 각화세포와 방사선에 노출된 3T3 섬유아세포 (irradiated 3T3 fibroblast)를 영양 공급층(feeder layer)으로 이용하여 피부 상피세포의 배양을 최초로 시행하였다. 이러한 방법을 통하여 상피의 면적을 수 백배 이상 확장시킬 수 있었으며 피부이식을 하기 어려운 광범위 3도 화상환자에 있어서 좋은 결과를 보여 주었다<sup>18)</sup>. 또한, Ueda 등<sup>19)</sup>은 구강 각화세포(oral keratinocyte)의 배양을 통하여 점막상피를 형성하여 구강 점막의 결손부 재건을 시행하여 좋은 결과를 보고하였다. 일반적으로 구강 각화세포는 피부의 각화세포에 비하여 분화도가 떨어지는

것으로 생각되며 따라서 세포의 대사가 빠르고 세포 배양에 걸리는 시간이 짧은 것으로 알려져 있다. 또한, 각화되어 있지 않은 구강상피 세포는 오랫동안 배양이 가능하며 구내에서 채취 할 수 있기 때문에 외부에 흉터가 남지 않아 공여부 부작용을 최소화 할 수 있다<sup>19)</sup>.

본 연구에서는 구강 각화상피의 배양을 위하여 소혈청 (bovine serum)과 영양 공급층 (feeder layer)으로 3T3 섬유아세포를 사용하였다. 임상에 적용 하기 위해서는 무혈청 배지에서 배양하는 것이 이상적이지만, 혈청이 없는 경우 세포의 증식능과 구조 보존성(structural integrity)이 저하되어 증충화에 어려움이 있었다<sup>20)</sup>. 또한 영양 공급층은 3T3 섬유아세포를 이용하였다. 3T3 섬유아세포는 증식능이 억제되어 세포 분열은 불가능 하지만 구강 각화 세포의 성장과 분화를 유도하고 TGF-β의 작용을 억제하는 인자를 분비하여 구강각화세포를 이용하는 실험에 많은 도움을 주는 세포이다. 본 실험에서는 마이토마이신-C에 처리된 3T3 세포를 이용하였다. 방사선에 조사된 세포는 마이토마이신-

C에 처리된 세포에 비하여 안정적이거나 비용과 처리 과정이 복잡하여 본 동물 실험에서는 마이트마이신-C를 처리한 세포를 사용하였다<sup>21)</sup>.

배지에는 각화세포의 생존을 향상시키기 위하여 여러 성분을 첨가하였다. 하이드로 코티손은 세포의 성장과 3T3세포의 분해를 막는 필수적인 존재이다. 콜레라 독소는 cAMP의 수준을 상승시켜 구강 각화세포가 커지는 것을 막고 말단분화(terminal differentiation)를 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 상피성장인자(EGF)는 각화 세포의 이동을 촉진시켜 구강 각화세포가 응집되는 것을 막고 일정한 층으로 증층화 되면서 성장하게 하며, 콜레라 독소와 독립적으로 최종분화를 방지하여 세포의 수를 늘리게 해준다. 인슐린과 트리아오도타이로닌은 혈청의 필요성을 20%에서 10%로 줄여주고 성장을 촉진시키는 역할을 한다<sup>22-24)</sup>.

본 실험에서 50mm<sup>2</sup>의 넓이의 구강상피를 채취하여 1주 배양 후 3,850mm<sup>2</sup> 넓이의 단층 구강각화상피층이 형성되었으며, 3주 후 동일 넓이의 상피 5~8층으로 배양되었다.

피부를 포함한 구강 내 재건 수술 후 모발이 자라거나 이식된 피부의 각질탈락으로 인한 구강 내 위생문제와 임플란트 주위의 염증 및 조직이 증식하고 피판의 부피가 너무 크거나 탄력성 부족으로 인하여 의치 사용시 기저부의 불안정성이 나타났다<sup>7,25)</sup>. 따라서 표면의 질감은 구내 점막 재건에 매우 중요한 요소이다. 표면 질감을 향상 시키기 위한 방법으로 Pribaz와 Fine<sup>26)</sup>에 의해 부분층 피부 이식술에 의한 전판상화가 제안되었으며, 적은 양의 점막이 필요할 경우 구강 내 다른 부위에서 적은 양의 점막을 이용하여 전판상화 시킨 후 재건에 이용하였다. 또한 Millesi 등<sup>27)</sup>은 혈류가 공급되는 비상피 조직을 따라 점막세포가 빠르게 성장하는 것을 관찰 하였으며, 이를 이용하여 비교적 넓은 점막층을 형성하는 실험을 시행하였다. 그러나 위의 방법은 8주 이상의 기간이 걸리며 아주 넓은 점막층을 형성하기 위해서는 점막을 많이 공여해야 하는 단점이 있다<sup>28)</sup>.

본 연구에서는 구강각화세포의 배양을 이용하여, 빠르고 배양을 조절 하기 쉬운 증층화된 점막층을 형성하였고 점막층을 근육으로 이식하기 위하여 실라스틱 박판을 이용하였다. 이식에 사용된 실라스틱 박판은 이식된 점막 세포와 피하층을 분리하는 역할과 점막 세포를 이동시키는 매개체로 사용되었으며 상부 결합조직과 분리된 점막 세포층은 근막 위에서 전판상화가 빨리 진행할 수 있게 해주었다<sup>27)</sup>.

조직공학적으로 형성된 피부에 관한 연구에서 진피 조직이 없는 경우 반흔 수축이 나타나, 이를 개선하기 위하여 표피 이식 전에 진피 조직을 이식한 후 그 위에 피부를 이식하는 실험이 진행되었으며 반흔 수축을 줄일 수 있음을 보여주었으나, 완전히 수축을 없애지는 못하였다<sup>29)</sup>.

조직공학적 방법에 의하여 배양된 점막 세포는 실라스틱

박판을 매개체로 이용하였을 때 이식에 적절하였다. 이식하고 7일 경과한 이후 이식된 점막층은 분해되기 시작하였으며, 14일이 경과한 후 거의 모든 점막층이 고유의 특성을 잃고 분해되는 소견이 관찰되었다. 이는 기저막을 형성하지 못하여 세포의 구조적 안정성이 떨어지고 세포 성장과 분화에 필요한 인자의 부족으로 인한 현상으로 추정된다.

Elshal 등<sup>30)</sup>에 의하면 상피 세포가 포함되지 않은 근막피판이나 근육 피판을 구강 내 재건에 사용할 경우 소성 결합조직인 근막이 있더라도 빠른 상피화는 일어나지 않으며 치유과정은 염증세포의 침윤과 육아조직의 형성 후에 주변으로부터 상피의 이동이 관찰되고 결과적으로 섬유화되는 과정이 된다고 보고하였다. 또한 근막을 포함하여 재건한 실험군이 근막을 제거한 실험군에 비하여 술 후 수축이 적으며 최종적으로 상피가 생성되는 과정에서 안정적인 구조를 가지는 상피를 가지는 것으로 보고되었다.

Woodley 등<sup>31)</sup>에 의하면 근막만 남기고 피부조직을 절제한 화상환자의 배양 각화조직 이식실험에서 'neo-dermis'가 생성되며, 면역조직화학 염색을 통하여 이식 후 나타나는 많은 결합조직의 요소를 관찰하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 하방 결합조직의 존재가 상피의 성장이나 분화에 필수적인 요소로 가정하여 근막을 제거하지 않고 실험을 시행하였으며 전판상화 시행 시 만족할 만한 결과를 관찰하였으나 10일 이상 전판상화 시키는 것은 dermal component가 없고 기저막을 형성하지 못하여 염증에 취약하고 구조적 무결성을 가지는 것으로 추정되었다.

본 실험에서 사용한 면역조직화학 염색은 세포의 분열능에 관한 면역염색과 세포의 고유 특성을 지니는지를 알아보는 면역염색을 시행하였다. Song 등<sup>15)</sup>은 배양된 구강점막 상피를 이용하여 세포의 분열능을 조사하였으며 배양 구강 상피에서 Ki-67을 이용한 면역화학염색에서 50% 이상 염색이 되는 것을 보고하였다. 본 연구에서 이식 7일째의 기저 세포층에서의 PCNA의 발현 백분율은 42%로 비교적 높게 나타났다. 그러나 10일 경과 후부터는 32%로 나타나지만 14일이 경과 후에는 발현되지 않았다. 위 결과로 볼 때, 체내에 이식된 배양점막 상피는 분열능이 낮아지고 염증반응으로 인한 세포의 상실로 10일에서 14일 기간에 이식된 배양점막의 구조적인 파괴가 나타나는 결과와 연관이 있는 것으로 보였다.

이식된 점막의 기저 세포층에서는 라미닌의 분비 및 침착이 관찰되었다. 그러나 라미닌은 하방 결합조직으로 침투하지 못했으며 이는 기저막이 형성되지 못하는 하나의 원인으로 생각되었다. 근막으로 라미닌의 침투는 후에 근-점막 피판 형성에 필수적이며 차후 이식 후 기저막 형성에 대해서 매우 필수적인 요소이다<sup>32-35)</sup>. 그러나 라미닌이 침투하기 전 배양 점막조직이 분해되어 기저막 형성에 실패한 것으로 생각되었다. 사이토케라틴 13과 14는 구강점막에 특이적으로

발현 하는 단백질로 본 실험에서는 점막층에 국한되어 발현되었으며, flap의 상층부가 이식된 점막세포임을 명확히 하였다.

미세 혈관은 7일, 10일 및 14일 경과군의 평균을 비교하였을 때 10일 경과 군에서 혈관화가 가장 잘 진행되는 것으로 보였으나 각 군간의 통계적인 유의성은 없었으며 14일 경과군에서 혈관화가 계속 진행되는 현상은 염증현상의 일부로 사료되었다.

Saito와 Itoh<sup>36)</sup>은 가토의 구강 협점막의 SEM과 TEM을 시행하였으며 점막의 표피층에는 구강 쪽으로는 미세 능선이 그리고 하방으로는 미세융모 형태의 돌기가 관찰되었다고 하였다. 하방의 돌기들은 썩기 같은 구조를 형성하였으며 이러한 썩기구조의 89.5%에서 돌기당 2개의 데스모솜을 관찰하였다고 보고하였다. 본 연구에서 상대적으로 덜 발달된 썩기 구조는 이식 전 배양 점막이 외력에 노출되지 않아 생기는 형태로 생각되었다. 하지만 대부분 시야에서 보이는 세포의 핵/세포질 비율이 높은 현상은 배양 점막 세포의 분열능이 높은 것으로 생각되었다.

본 연구에서 근-점막 피판의 최종 목표는 이식된 배양 점막이 근막에 완전히 생착하는 현상을 관찰하는 것이다. Cinamon 등<sup>16)</sup>은 인간의 시신 피부를 백서의 창상에 이식하여 얻어진 결과를 토대로 하여 3개의 육안 관찰 항목과 3개의 현미경 관찰 항목을 종합하여 생착율에 관한 체계를 만들었다. 이식 기간에 따른 생착율의 변화는 7일 경과 시 가장 좋게 나타나며 10일 군과 14일 군에서는 통계적으로 유의성이 없었으나(p=0.07) 7일과 10일 군, 7일과 14일 군에서는 통계적으로 유의할 만한 변화가 관찰되었다(p<0.05). 이는 7일과 10일 사이에 생착율에 영향을 주는 현상이 일어나며 생착율의 급격한 저하는 결과적으로 전판상화의 실패로 나타났다. 농이나 조직액이 차는 현상은 나타나지 않았으나 이식된 부위로 심한 발적 현상이 관찰되었으며 이는 염증반응이 존재하는 것으로 사료되었다.

## V. 결 론

1. 가토의 협점막에서 구강각화상피세포를 추출한 후, 실험실에서 배양과정을 거쳐 약 75배 넓이의 이식 가능한 중층화된 구강각화상피를 배양하였다.
2. 배양된 구강 상피는 근막에 점막근조직판을 형성하였으며, 배양 점막 상피세포는 체내 광배근 근막위에서 증식되었다. 세포층은 이식전 배양 점막이 6.5±1.05층, 이식 7일 경과 시 19.8±4.59층, 이식 10일 경과 후 14.3±4.01층으로 관찰되었으나 이식 14일 경과 후 평균 2.83±1.15층으로 줄어들었다. 생착율은 이식 7일 경과 시 100%였으나 10일 및 14일 경과 시 33%로 낮아졌다.

3. 배양 구강 상피를 이식하였을 때 기저세포층에서 증식소견을 보였으며 라미닌이 분비되었으나 기저막은 형성하지 못하였다.
4. 배양 구강 상피를 이용하여 구강 내 결손부 재건을 위한 점막근조직판을 형성하였다.

## 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. Maxwell GP, Leonard LG, Manson PN : Craniofacial coverage using the latissimus dorsi myocutaneous island flap. Ann Plast Surg 4 : 410, 1980.
6. Nehrer-Tairysh GV, Millesi W, Schuhfried 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. Lauer G, Schimming R, Gellrich NC et al : Prelaminating the fascial radial forearm flap by using tissue-engineered mucosa: improvement of donor and recipient sites. Plast Reconstr Surg 108 : 1564, 2001.
8. Losken A, Carlson GW, Culbertson JH et al : Omental free flap reconstruction in complex head and neck deformities. Head Neck 24 : 326, 2002.
9. Rath T, Millesi W, Millesi-Schobel G, et al : Mucosal prelamination of a radial forearm flap for intraoral reconstruction. J Reconstr Microsurg 13 : 507, 1997.
10. Rath T, Tairysh GV, Frey M, et al : Neuromucosal prelaminated flaps for reconstruction of intraoral lining defects after radical tumor resection. Plast Reconstr Surg 103 : 821, 1999.
11. Poeschl PW, Kermer C, Wagner A et al : The radial free forearm flap—prelaminated versus non-prelaminated: a comparison of two methods. Int J Oral Maxillofac Surg 32 : 159, 2003.
12. Breidahl AF, Judson RT, Dumble LJ et al : In vitro culture of disaggregated rabbit keratinocytes. Immunol Cell Biol 68 : 119, 1990.
13. Forrest CR, Pang CY : Latissimus dorsi musculocutaneous flap model in the rabbit: a hemodynamic and anatomical study. Ann Plast Surg 21 : 335, 1988.
14. Weibel ER : Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. J Microsc 155 : 393, 1989.
15. Song J, Izumi K, Lanigan T et al : Development and characterization of a canine oral mucosa equivalent in a serum-free environment. J Biomed Mater Res 71A : 143, 2004.
16. Cinamon U, Eldad A, Chaouat M et al : A simplified testing system to evaluate performance after transplantation of human skin preserved in glycerol or in liquid nitrogen. J Burn Care Rehabil 14 : 435, 1993.
17. Rheinwald JG, Green H : Serial cultivation of strains of

- human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 331, 1975.
18. 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.
  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. Johnson MC, Meyer AA, deSerres S et al : Persistence of fetal bovine serum proteins in human keratinocytes. *J Burn Care Rehabil* 11 : 504, 1990.
  21. 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.
  22. Werner S : Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev* 9 : 153, 1989.
  23. Gibbs S, Silva Pinto AN, Murli S et al : Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen* 8 : 192, 2000.
  24. Hill MW, Mackenzie IC : The influence of subepithelial connective tissues on epithelial proliferation in the adult mouse. *Cell Tissue Res* 255 : 179, 1989.
  25. Mitchell DL, Synnot SA, VanDercreek JA : Tissue reaction involving an intraoral skin graft and CP titanium abutments: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 5 : 79, 1990.
  26. Pribaz JJ, Fine NA. Prelamination : defining the prefabricated flap—a case report and review. *Microsurgery* 15 : 618, 1994.
  27. Carls FR, Jackson IT, Behl AK : Prefabrication of mucosal-lined flaps: a preliminary study in the pig model. *Plast Reconstr Surg* 101 : 1022, 1998.
  28. Millesi W, Rath T, Millesi-Schobel G et al : Reconstruction of the floor of the mouth with a fascial radial forearm flap, prelaminated with autologous mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27 : 106, 1998.
  29. Feinberg SE, Krishnan V, Gordillo G : Intraoral grafting of a canine full-thickness oral mucosal equivalent produced in vitro. *J Oral Maxillofac Surg* 47 : 712, 1989.
  30. Elshal EE, Inokuchi T, Yoshida S et al : A comparative study of epithelialization of subcutaneous fascial flaps and muscle-only flaps in the oral cavity. A rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27 : 141, 1998.
  31. Woodley DT, Briggaman RA, Herzog SR : Characterization of "neo-dermis" formation beneath cultured human epidermal autografts transplanted on muscle fascia. *J Invest Dermatol* 95 : 20, 1990.
  32. Petersen MJ, Lessane B, Woodley DT : Characterization of cellular elements in healed cultured keratinocyte autografts used to cover burn wounds. *Arch Dermatol* 126 : 175, 1990.
  33. Mackenzie IC, Hill MW : Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse. *Cell Tissue Res* 235 : 551, 1984.
  34. Hill MW, Mackenzie IC : The influence of differing connective tissue substrates on the maintenance of adult stratified squamous epithelia. *Cell Tissue Res* 237 : 473, 1984.
  35. Ekblom P, Sariola H, Thesleff I : Basement membrane and organogenesis. *Prog Clin Biol Res* 171 : 109, 1985.
  36. Saito H, Itoh I : Ultrastructural study of rabbit buccal epithelial cells and intercellular junction by scanning and transmission electron microscopy. *J Electron Microsc* 42 : 389, 1993.

**저자 연락처**

우편번호 110-768  
 서울특별시 종로구 연건동 275-1  
 서울대학교 치의학 대학원 구강악안면외과학교실 및 치학연구소  
**이종호**

원고 접수일 2004년 11월 17일  
 게재 확정일 2005년 1월 29일

**Reprint Requests**

**Jong-Ho Lee**  
 Department of Oral and Maxillofacial surgery, Graduate School of Dentistry, Seoul National University & Dental Research Institute # 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 17 November 2004  
 Paper accepted 29 January 2005