

토끼 기관에 이식한 혈행성 연골막-구강점막
복합피판의 형태학적 연구 : III. 면역조직화학적 연구

분당차병원 이비인후과

김 은 서

= Abstracts =

Morphologic Study on a Vascularized Composite Flap
for Tracheal Reconstruction in Rabbit : III. Immunohistochemical Study

Eun-Seo Kim M.D.

*Department of Otorhinolaryngology, Pundang Cha General Hospital
Sungnam, Korea*

Successful regeneration of a cartilage framework using perichondrium has been reported by several authors but there are some arguments surrounding mucosal regeneration. Some authors report that regeneration of mucosa is completed by ingrowth from neighboring tissue but others insist that it occurs via metaplasia from the squamous epithelium.

This study was designed to investigate the differences, especially in mucosal regeneration between nonvascularized and vascularized flaps via immunohistochemical study. A morphologic study was carried out to elucidate the characteristics of the regenerated mucosa which was sutured on the vascularized perichondrium and fabricated in a rabbit ear. A nonvascularized perichondrial-mucosal composite flap with the same dimension was transferred in the control group.

BrdU was labelled on both normal mucosa and grafted mucosa in the experimental group without any statistically significant differences. In cytokeratin stain, it was regarded that mucosal coverage of the control group occurred by ingrowth from the neighboring mucosa. It can be conceived that metaplasia of the grafted mucosa occurs in a vascularized composite flap transferred group.

Key Words : Tracheal mucosal regeneration, Perichondrial-mucosal composite flap, Vascularized flap, Metaplasia, Ingrowth

I. 서 론

기도협착의 치료에 있어서 필수적인 조건은 안정되고 유연한 연골골격과 함께, 호흡상피로 피복되는 기관점막이라고 할 수 있다. 구조적인 안정성을 위해서는 여러가지 이식물이 이용되고 있으며 그 중 하나인 연골막을 이용한 재건이 1970년대초 토끼에서 성공적으로 이루어졌다²¹⁾.

그러나 기관점막의 재건에 대해서는 보고자에 따라 이견이 많다. Farkas등⁵⁾은 개의 제 2, 3, 4 기관연골를 제거하고 구강점막과 이개연골로 복합피판을 형성한 후 이를 이식하는 방법으로 기도를 재건하였는데, 14개월 후의 조직검사상 기관내면이 호흡성상피로 피복되었음을 확인하였고, 이에 대해 주위 기관상피로부터의 이행(ingrowth)이 아니라 화생(metaplasia)이라고 주장하였다. 한편 Drettner등⁵⁾은 비중격의 연골과 점막으로 구성된 복합피판을 이식한 개에서 11내지 12개월이 경과하면 연골은 대부분 소실되어 섬유성 결합조직으로 대체되고, 이식한 비강점막의 편평상피는 원주상피로 전이된다고 보고함으로써 Flemming등⁷⁾의 보고를 뒷받침하였다. 그는 이것이 초기의 부분적인 혹은 전체적인 상피피사 후 주위 기관 점막 상피로부터의 이행(ingrowth)에 의한 것이거나 혹은 직접 출현한 원주상피로 추정하였다⁵⁾.

1990년대에 들어서는 미세 혈관수술의 급속한 발전에 힘입어 혈행성 피판을 이용한 연구들이 활발히 보고되고 있다^{3,11)}. 그러나 이러한 보고들에서 밝히고 있지 못한 부분들, 특히, 기관재건에 사용된 피판의 구성상태에 따라, 이식된 점막의 복원 및 재생과정에 어떤 차이가 있는지를 규명하는 것은 매우 중요한 문제라고 생각된다.

이를 위해 저자는 광학현미경적 연구와 주사전자 현미경적 연구를 통해 피판의 상태에 따른 이식점막의 운명 및 기관내관의 재건과정, 그리고 점막상피의 섬모 재생과정을 연구한 바 있으며^{1,2)}, 이어서 피판의 구성 형태에 따라 재생된 점막에 어떤 차이가 있는지를 면역조직화학적 연구를 통하여 규명하고자 하였다.

동·정맥 혈관경을 가진 연골막에 구강점막을 봉합하여 점막의 재혈행화를 시도한 경우를 실험군

으로 하였으며, 혈관경이 없이 복합피판을 유리이식한 경우를 대조군으로 하였다. 이와 같은 방법을 통해 점막재생이 주위조직의 이동에 의해 일어나는지 또는 이식점막의 화생(metaplasia)에 의한 것인지를 규명해 보고자 하였다. BrdU 표지세포 검색을 통해 이식 점막과 정상 기관 점막의 증식능력을 비교관찰하였고, 결손부에 재건된 점막과 정상 기관 점막의 세포학적 성상을 비교하기 위하여 세포내 중간형 필라멘트(intermediate filament)인 cytoke-ratin에 대한 항체를 이용한 면역조직화학염색을 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

체중 2.5 - 3 Kg의 성숙한 토끼를 암수 구별없이 사용하였다. 토끼는 동물실의 환경에 적응할 수 있도록 1주일 이상을 사육한 후 실험에 사용하였으며 실험전 최소한 12시간 이상의 공복을 유지하도록 하였다. 10마리를 실험군 및 대조군의 두 군으로 나누어 각 군당 5마리씩으로 하였다.

이식점막과 정상 기관점막의 증식능력을 비교관찰하기 위해 BrdU 항체로 시행한 면역조직화학염색에는 상기의 조건에 준하여 각 군당 6마리씩 12마리의 토끼를 이용하였다.

2. 방법

혈행성(vascularized) 및 비혈행성 복합피판(non-vascularized composite flap)의 이식에 따른 피판의 도안, 실험방법, 수술 전후의 처치는 이전에 시행한 저자의 연구방법과 동일하였다¹⁾.

가. BrdU 표지세포 검색

12마리의 토끼를 각 군당 6마리씩으로 하였으며 각 군에서는 수술 후 1일과 2일에 각각 3마리씩으로 일련의 과정을 진행하였다. 시료를 채취하기 1시간 전, 10mM의 BrdU(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 체중 1Kg당 2ml씩 복강에 주입하였다. 주입 후 1시간이 경과하면 시료를 채취하여 5시간동안 포르말린에 고정한 후 PBS로 세척하였다. 5% EDTA 용액에서 탈석회화한 후 과라

편에 포매하고 5 μ m의 두께로 파라핀 블럭을 절단하였으며 xylene으로 절편의 파라핀을 제거하였다. 100%와 95% ethanol로 각각 2회 탈수한 후 pure methanol과 1% H₂O₂가 혼합된 용액에 30분간 담구었다가 PBS로 세척하고 15% 태아 우혈청(fetal bovine serum)과 1% triton X-100의 혼합용액을 15분간 점적하였다. 증류수로 비이온화하고 37°C에서 2M HCl에 15분간 배양한 후 0.1M Na₂B₄O₇로 4회 세척하고 이어 PBS로 4회 세척하였다. 1:500 희석한 단클론 항BrdU 항체(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 biotinylated 항체(PK4002 mouse mono IgG, DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)로 처리하고 ABC kit로 40분간 반응시켰다. 이어 0.05% DAB(diaminobenzidine tetrahydrochloride)용액(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 처리하고 광학현미경하에서 반응을 관찰하였다. 반응이 나타나면 세척 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하였으며 다시 일련의 세척과정 후 crystal mount를 시행하고 80°C slide warmer에서 10분간 건조시킨 후 BrdU 표지세포를 검색하여 이식점막과 정상 기관점막의 증식능력을 비교 관찰하였다.

나. cytokeratin 발현 검색

통상의 면역조직화학적 염색방법을 이용하였고 협점막의 근육조직을 음성대조군으로 하였다. Xylene으로 파라핀을 제거한 후 10분간 흐르는 물에 수세하고 pure methanol과 0.3% H₂O₂가 혼합된 용액에 30분간 담구 후 PBS로 세척하고 1% 우혈청 albumin을 실온에서 5분간 점적하였다. 증류수로 비이온화 한 후 일련의 세척과정을 거쳐 각각 cytokeratin 8 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA), cytokeratin 13 (BioGenex Lab., San Ramon, CA, USA), cytokeratin 18 (BioGenex Lab., San Ramon, CA, USA), Cytokeratin 19 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA) 및 cytokeratin 20 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)을 처리하여 4°C에서 하룻밤동안 반응시켰으며 biotinylated anti-mouse IgG(DAKO Corp, Carpinteria, CA, USA)와 biotinylated anti-rabbit IgG(DAKO Corp, Car-

pinteria, CA, USA)에 1시간 처리하고 LSAB kit로 40분간 반응시켰다. 이어 peroxidase conjugated streptavidin에 1시간 동안 반응시키고 PBS로 세척한 후 3-amino-9-ethylcarbazole로 발색시켰다. 증류수로 세척한 후 hematoxylin으로 대조염색하였으며 일련의 탈수과정을 거쳐 관찰하였다. 이와 같이하여 이식한 협점막이 재건 과정을 거치면서, 상피층의 세포내 cytokeratin 발현양상에 어떤 변화가 생기는 지를 알아보았으며 또한 정상 기관점막 상피세포의 발현양상과 비교하였다.

III. 결 과

가. BrdU 표지세포 검색

BrdU 표지세포를 검색한 결과 대조군에서는 수술 후 1일과 2일에 채취한 모든 표본의 이식점막에서 표지세포가 관찰되지 않은 반면(Fig. 1A), 실험군에서는 수술 후 2일에 채취한 표본의 이식점막의 상피세포 기저층에서 BrdU 표지세포가 관찰되었다(Fig. 1B). 그러나 500개의 기저세포를 세어 양성세포의 백분율로 계산한 표지지수(index)상 주변부의 정상점막층과 유의할 만한 차이는 없었다.

나. Cytokeratin 발현 검색

Cytokeratin의 아형 8, 13, 18, 19, 20에 대한 항체를 이용하였으며 협점막의 근육조직을 음성 대조군으로 하였다. Cytokeratin 8의 경우 정상 기관점막에는 음성이었던 반면(Fig. 2A) 정상 협점막에는 강하게 염색되는 소견이었다(Fig. 2B). 한편 실험군의 2주 표본중 편평상피양 세포로 구성된 부위는 정상 협점막 상피조직과는 달리 cytokeratin 8에 염색이 되지 않는 이상 발현(aberrant expression)을 보였으며 이것은 정상 호흡상피와 동일한 발현양상이었다(Fig. 2C).

Cytokeratin 18의 경우 정상 호흡상피와 정상 협점막 상피에는 음성이었다(Fig. 3A, B). 그러나 실험군 4주 표본중 결손부에 재생된 원주상피에는 강하게 염색되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C). 이는 공여조직과 수혜부 정상조직의 염색양상과 전혀 상이한 발현양상이었다.

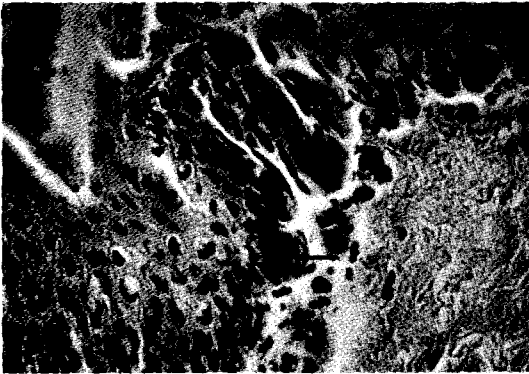
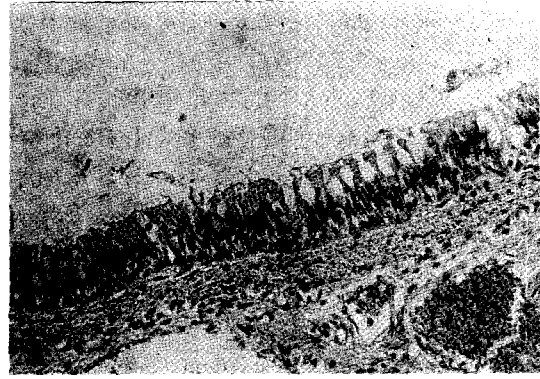


Fig 1. BrdU labeling of tracheal epithelium 2 days after graft. A: no labeled cell in control group. B: Arrow-labeled nuclei of epithelium in experimental group (x400).

IV. 고 찰

기관 손상 후 초래된 협착을 성공적으로 치료하는데 있어서의 관건은 협착부위를 절제한 후 결손부위를 원활히 재건하는 것인데, 골격으로서의 연골의 재건과 아울러 골격 내면에 피복되는 점막의 재생이 정상적으로 신속히 이루어 지도록 하는 것이 필수적이다.

기관 점막이 손상된 후의 상피 재생에 관해서는 오래 전부터 연구되어 왔으며^{8, 10, 12, 13, 20, 25)} 그 과정은 비교적 잘 정립되어 있는데, hamster의 경우 기도점막을 인위적으로 제거하면 정상 조직과 인접한 결손부 주변에서부터 편평상피양 세포들이 출현하기 시작하여 결손부의 중심을 향해 이동한다. 시간이 경과하면서 이 세포들은 강한 증식반응으

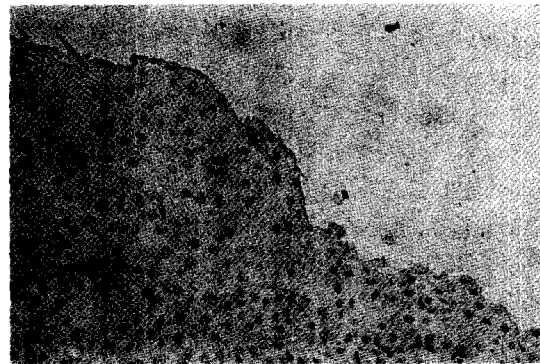


Fig. 2. Cytokeratin 8 staining 2 weeks after graft. A: negative in normal mucosa. B: strong positive in normal buccal mucosa. C: negative in squamous epithelium which was located in defective area in experimental group (x200).

로 여러층을 이루게 되고 상피양 화생(epidermoid metaplasia)의 시기를 거치며 이후 세포는 정상적인 호흡상피로 분화되는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 이러한 상피조직 재생과정의 초기에 일어나는 편평

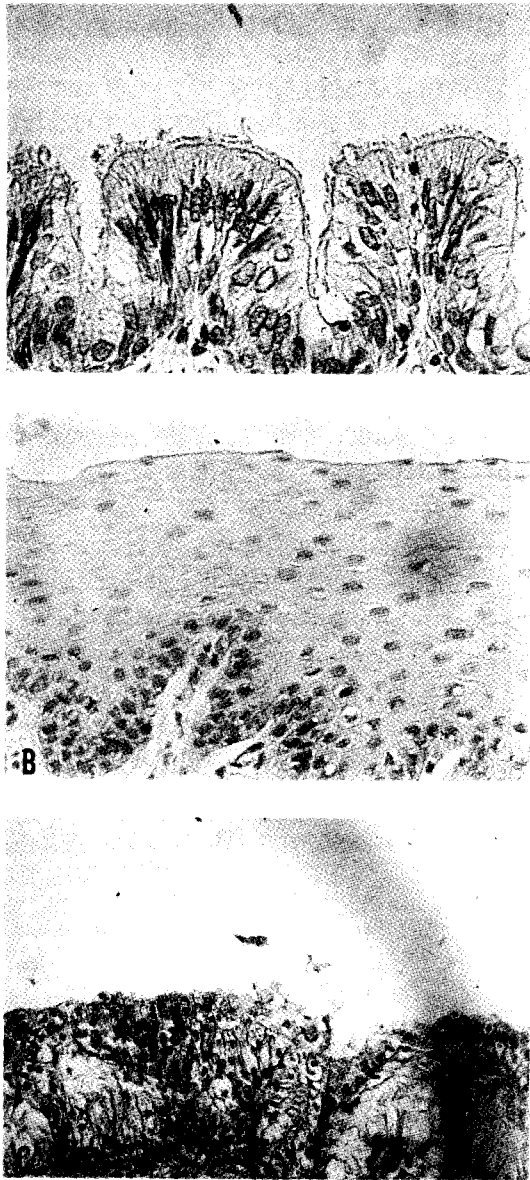


Fig. 3. Cytokeratin 18 staining 2 weeks after graft. A, B: negative in normal tracheal and buccal mucosa. C: strong positive in experimental group (x400).

상피양 세포의 출현과 세포의 이동에는 기저 세포(basal cell)가 중요한 역할을 한다^{8,10,11,15,21}. 이 세포들은 미분화된 세포들로서 증식과 분화의 과정을 거쳐 다른 형태의 세포로 발전할 수 있는 능력

을 가지고 있는 세포군으로 알려져 있으며, 기저세포 외에도 배세포(goblet cell)와 소 점액 과립세포(small mucous granule cell)도 유사한 기능을 가진 것으로 밝혀져 있다¹⁶. 기관의 점막층만을 제거한 후 점막의 재생을 시간 별로 관찰한 실험에 의하면 점막이 손상된 후 2시간 내지 12시간 사이에 결손부 주변의 상피조직이 결손부를 향해 이동하는 것이 관찰된다¹⁶. 본 연구에서는 1주 이내에 관찰한 표본은 없었으나 후에 상술한 BrdU 표지세포를 검색하는 실험에서 수술 후 2일째 표본의 정상 상피조직 기저층의 활발한 세포증식이 확인된 것으로 미루어 보아 이식피판의 피사과정과 함께 정상 상피조직에 이미 존재하고 있던 기저세포와 점액세포들에 의해 조직이동이 진행되었으리라 사료된다. 결과적으로, 본 연구의 대조군과 같이 혈행이 유지되지 않는 점막의 이식은 불필요할 것으로 생각할 수 있고 또한 점막을 이식하지 않아도 점막의 재건은 이루어진다는 여러 실험적 결과들을 토대로 생각할 때 점막이식의 필요성은 더욱 경감된다고 할 수 있다. 그러나 결손부가 큰 경우, 점막을 이식하지 않는다면 육아조직과 섬유조직의 증식을 효과적으로 차단하면서 재상피화가 순조롭게 이루어질 수 있을 지는 의문이다. 이에 대해서 정량적인 자료를 구체적으로 보고한 연구는 없으나 육아조직이나 섬유조직의 증식에 의해 상피의 이동이 단절되는 것과 같은 문제를 방지, 또는 해결하는 데 이식점막이 부분적으로 도움이 될 수 있으리라 생각된다^{3,19}.

기관점막이 손상되면 약 24시간에서 72시간 사이에 최고의 재생능력을 보인다¹³. 즉 수상 후 2내지 12시간 경부터 손상받은 주변의 점막에서 비점모성 세포들이 결손부를 향하여 이동하는 것으로 알려져 있는데 이들은 기저세포나 점액세포로 구성되어 있다¹⁶. 세포분열의 활성도는 수상 후 24시간부터 증가하기 시작하여 48시간경에는 상피세포 전층에서 활발한 세포분열을 관찰할 수 있다고 보고되어 있다^{13,16}. 연구자는 이러한 연구결과를 근거로 피판이식 후 1일과 2일에 BrdU 표지세포를 검색하였다. BrdU 검색결과 대조군에서는 술 후 1일과 2일의 모든 표본의 이식점막에서 표지세포가 관찰되지 않았는데, 이는 위에 기술한 바와 같이 이

식 점막이 괴사된 것과 일치하는 소견으로 생각된다. 반면 실험군에서는 술 후 2일의 이식점막 상피의 기저부에 다수의 표지세포가 존재하는 것이 확인되었고 이는 술 후 1주일에 관찰한 표본에서 이식조직이 생존한 소견과 부합하는 것이었다. 그러나 결손부 주변의 정상점막에서도 유사한 정도의 표지세포가 검색되어, 혈행이 유지되어 있는 피관의 점막은 그 자체가 기관내강을 피복하는 점막으로 재건되기도 하지만 대조군에서와 같이 주변조직의 이동에 의한 재건도 일부 기여하였을 것으로 추정된다.

편평상피가 원주상피로 전환될 가능성에 대해서는 일찍이 1940년대부터 제기된 후²³⁾ 실험적으로 증명하려는 노력들이 있어왔다^{5,7,17,22)}. 이들은 이러한 세포의 화생이 그 위치의 상피세포로부터 *in situ*의 기전으로 발생하든지 또는 주위 조직으로부터의 전이에 의한다고 보고하였다. 한편 Ohlsen 등¹⁸⁾은 이식한 편평상피가 원주상피로, 후에는 섬모성 원주상피로 분화하는 것을 관찰함으로써, 호흡상피의 결손부위에 이식한 편평상피내에서 일련의 화생과정이 연속적으로 진행된다고 생각하였다.

본 연구에서는 cytokeratin 염색을 통해 이식점막상피의 세포내 발현양상이 이식전과 비교하여 어떻게 변화하는 지를 알아봄으로써 실험군에서의 상피피복이 이식점막의 화생일 가능성을 찾아 보고자 하였는데 cytokeratin 8에 대한 이식점막의 염색상이 정상 기관점막과 동일하게 변화한 것으로 미루어 볼 때, 실험군의 점막재건과 편평세포의 화생과의 연관성은 더욱 추구해 볼 필요가 있다고 생각된다. Cytokeratin 8과 비슷하게 cytokeratin 18의 경우, 이식점막의 염색상이 정상 기관점막이나 협점막과는 상이하었던 바, 최소한 기관에 이식한 협점막이 구강에 위치할 때와는 다른 성상을 가지게 된다는 것을 의미한다고 말할 수 있다. 그러나 cytokeratin의 2가지 아형의 염색상만으로 화생의 여부를 단정한다는 것은 어려운 것으로 생각되며 향후 다양한 cytokeratin 아형을 이용한 면역조직화학적 연구와 아울러 세포간 물질이 세포분화에 영향을 끼치는 미세환경(microenvironment)에 대한 연구가 필요하리라고 본다.

V. 결 론

혈행이 유지된 이개연골막에 구강점막을 봉합하여 복합피관을 구성한 후 기도 결손부에 이식하고, 재건되는 점막을 면역조직화학염색을 통해 형태학적으로 관찰하였다. 대조군은 혈행이 유지되지 않는 유리연골막에 구강점막을 봉합하여 이식한 경우로 하였다.

결손부에 이식한 점막과 주변의 정상 점막사이의 재생능의 차이를 BrdU 표지세포 검색을 통하여 규명하려고 하였으며 이식점막 상피의 세포적 특성을 알기 위해 정상 기도점막과 협점막의 상피와 함께 cytokeratin에 대한 아형별 발현 양상을 상호 비교해 보았다.

그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. BrdU 표지세포 검색은 이식점막이 혈행성 피관위에서 재생능을 가지면서 새로운 환경에서 생존함을 시사하였으나 결손부 주변의 정상점막과의 차이를 관찰하지는 못했다.
2. Cytokeratin에 대한 이식점막의 이상발현을 토대로, 실험군에서는 이식점막이 호흡상피로 화생되었을 가능성을 추정할 수 있었다.

References

1. 김은서, 홍원표, 이정권 등: 토끼 기관에 이식한 혈행성 연골막-구강점막 복합피관의 형태학적 연구: I. 광학현미경적 연구. 한이인지 40: 185-196, 1997
2. 김은서: 토끼 기관에 이식한 혈행성 연골막-구강점막 복합피관의 형태학적 연구: II. 전자현미경적 연구. 임상이비 8: 84-90, 1997
3. Delaere PR, Boeckx WD, Vandamme B, Guelinckx PJ, Ostyn F: *Perichondrial microvascular free transfer: Creation of a compound flap for laryngeal reconstruction in rabbit. Ann Otol Laryngol 101: 265-269, 1992*
4. Delaere PR, Ostyn F, Mebis J, Damme BV, Boeckx WD, Feenstra L: *Experimental transferable vascular bed for laryngo-*

- tracheal reconstruction: Further observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102: 144-151, 1993
5. Drettner B, Lindholm CE: *Experimental tracheal reconstruction with composite graft from nasal septum*. *Acta Otolaryngol* 70: 401-407, 1970
 6. Farkas LG, Farmer AW, McCain WG, Wilson WD: *Replacement of a tracheal defect in the dog by a preformed composite graft*. *Plast Reconstr Surg* 50: 238-241, 1972
 7. Flemming I, Hommerich KW: *Tracheal stenosis: Development and the latest state of experimental surgery*. *ORL* 36: 179-184, 1974
 8. Gordon RE, Lane BP: *Cytokinetics of rat tracheal epithelium stimulated by mechanical trauma*. *Cell Tissue Kinet* 10: 171-181, 1977
 9. Gordon RE, Lane BP: *Ciliated cell differentiation in regenerating rat tracheal epithelium*. *Lung* 162: 233-243, 1984
 10. Greenberg SD, Willms RK: *Regeneration of respiratory epithelium. An experimental study in dogs*. *Arch Pathol* 73: 65-70, 1962
 11. Hilding AC: *Regeneration of respiratory epithelium after minimal surface trauma*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 74: 903-914, 1965
 12. Keenan KP, Combs JW, McDowell EM: *Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury*. *Virchows Arch* 41: 193-214, 1982
 13. Keenan KP, Wilson TS, McDowell EM: *Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury*. *Virchows Arch* 43: 213-240, 1983
 14. Lamb D, Reid L: *Mitotic rates, goblet cell increase and histochemical changes in mucus in rat bronchial epithelium during exposure to sulphur dioxide*. *J Pathol Bacteriol* 96: 97-111, 1968
 15. Lane BP, Gordon RE: *Regeneration of rat tracheal epithelium after mechanical injury. I. The relationship between mitotic activity and cellular differentiation*. *Proc Soc Exp Biol Med* 145: 1139-1144, 1974
 16. McDowell EM, Becci PJ, Schurch W, Trump BF: *The respiratory epithelium. VII. Epidermoid metaplasia of hamster tracheal epithelium during regeneration following mechanical injury*. *J Natl Cancer Inst* 62: 995-1008, 1979
 17. Nordin U: *The regeneration after cuff-induced tracheal injury*. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 94: 514-519, 1982
 18. Ohlsen L, Nordin U: *Tracheal reconstruction with perichondrial grafts*. *Scand J Plast Reconstr Surg* 10: 135-145, 1976
 19. Ohlsen L, Nordin U: *Experimental laryngeal reconstruction with preformed composite graft*. *Scand J Plast Reconstr Surg* 20: 259-271, 1986
 20. Sanderud K: *Squamous metaplasia of the respiratory tract epithelium. 5. A contribution to the pathogenesis of metaplasia. Two experimental studies*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 44: 345-362, 1958
 21. Skoog T, Ohlsen L, Sohn SA: *Perichondrial potential for cartilaginous regeneration*. *Scand J Plast Reconstr Surg* 6: 123-125, 1972
 22. Swift E, Grindlay JH, Clagett OT: *The repair of tracheal defects with fascia and tantalum mesh: An experimental study*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 24: 482-492, 1952
 23. Taffel M: *The repair of tracheal and bronchial defects with free fascia graft*. *Surgery* 8:56-62, 1940
 24. Wells AB: *The kinetics of cell proliferation in the tracheobronchial epithelia of*

rats with and without chronic respiratory disease. Cell Tissue Kinet 3: 185-206, 1970

25. Wilhelm DL: *Regeneration of tracheal epithelium. J Pathol Bacteriol 65: 543-550, 1953*