

백서 구개의 외과적 결손부에 자가배양상피조직 이식 및 TGF-β3 투여가 상악골의 성장에 미치는 영향

박정현 · 최병호 · 강정완 · 육종인* · 김진* · 이충국

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 연세대학교 치과대학 구강병리학교실*

Abstract

MAXILLARY GROWTH FOLLOWING CULTURED EPIDERMAL TISSUE GRAFT AND THE ADMINISTRATION OF TGF-β3 ON SURGICALLY CREATED PALATAL DEFECTS IN RAT

Jung-Hyun Park, Byung-Ho Choi, Jung-Wan Kang, Jong-In Yook*, Jin Kim*, Choong-Kook Yi

Dept of Oral & Maxillofacial Surgery, Oral Pathology*, College of Dentistry, Yonsei University

This study was designed to evaluate the influence of cultured epidermal tissue graft and the administration of transforming growth factor(TGF)-β3 on maxillary growth in surgically created palatal defects. A total of 155 rats were divided into 2 groups according to surgical timing : postnatal 2 weeks(n=95), 4 weeks(n=40) and control(unoperated) group(n=20). The postnatal 2-week surgical group was subdivided into 3 groups according to repair methods: conventional surgery(Von Langenbeck technique)group(n=23); cultured tissue graft group(n=25); and full thickness skin graft group(n=25). Additionally, recombinant human TGF-β3 was administered(30ng or 150ng) on collagen matrix in surgically created palatal defects during surgery(9 conventional surgeries, 9 cultured tissue grafts) in 2-week-old rats.

The results showed that all types of surgical treatment decreased maxillary growth compared with the control(unoperated) group(p<0.0001). On the other hand, the tissue graft group, whether cultured tissue or grafted skin, contributed to increased maxillary growth(p<0.0001). And exogenous TGF-β3 might play a role in connective tissue proliferation and new bone generation during wound healing on palatal defects.

Our results suggest that grafting cultured epidermis with collagen matrix decreases the scar tension on maxillary growth more than conventional palatal surgery does. Therefore, exogenous TGF-β3 may contribute to accelerate wound healing on palatal defects.

Key words : Cleft palate, Maxillary growth, Cultured epidermis graft, Transforming growth factor beta 3

I. 서론

구순구개열환자의 많은 경우에 상악골이 열성장하는 것을 흔히 임상적으로 경험한다. Ross는 구순구개열환자를 수술 및 교정 치료 등의 노력에도 불구하고 이들 중 25%는 성장이 완료된 후 악교정수술이 필요하였다고 보고하였다¹⁾. 상악골 열성장에 기여하는 요인 중에서도 수술시기 및 방법이 성장에 중요한 영향을 미치며 많은 학자들이 수술후 불가피하게 야기되는 반흔조직의 수축과 주위조직의 긴장을 성장을 저해하는 이유로 지적하고 있다²⁻⁶⁾. 이를 입증하기 위한 동물실험에서도 정도의 차이는 있지만 반흔조직이나 주위 연조직의 긴장이 상악골의 폭경 및 길이 성

장을 제한함이 밝혀진 바 있다. 또한 동물실험에서 통상적인 구개열봉합술후 구개부 양측으로 노출되는 골면의 상부가 이차 유합(secondary intention)되는 과정에서 일어나는 창상의 수축이 치아를 내측으로 견인하여 구개폭경의 성장을 제한함을 보고한 바 있다. 창상의 치유과정에서 일어나는 수축 및 반흔조직을 최소화하기 위해 일반적으로 조직결손부에 피부이식이 의학계 여러 분야에서 광범위하게 사용되어 왔다. 그러나 진피를 포함한 전층피부이식일수록 창상 수축과 반흔조직이 작지만 조직의 결손부가 클수록 공여부에 또 다른 결손을 남기기 때문에 진피를 포함한 이식조직의 채취양에는 제한이 있다. 최근 들어 이러한 조직 결손부를 생체조직공학을 이용하여 피부조직을 배양하여 이식하기 위해 많은 시도가 이루어지고 있다. 그러나 구순구개열 분야에서 구개열에 자가 배양조직을 이식하여 성장에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 아직 보고된 바가 없는 실정이다. 저자는 백서에서 구개열과 유사한 환경을 외과적으로 형성하여 구개 결손부에 배양상피조직을 이식한 후 이식조직의 생착을 관찰하고 장기적으로 백서 상악골의 성장에 미치는 영향을 관찰하고 통상적인 수술법을 시행한 백서의 상악골 성장과 비교해 보고자

이충국

120-752, 서울시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Choong-Kook Yi

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Yonsei University

134, Shinchon-Dong, Seodaemoon-Gu, Seoul, 120-752, Korea

Tel. +82-2-361-8762 Fax. +82-2-364-0992

하였다.

Kremenak은 구개열의 일차수술후 창상의 치유과정에서 성장인자의 작용에 대한 연구를 제안한 바 있다⁷⁾. 그 이후 구순구개열과 관련하여 성장인자에 대한 대부분의 연구는 구순구개열의 발생과정에서의 성장인자의 역할에 초점을 맞추어 진행되어 왔다. 최근에는 성장인자 가운데 Transforming growth factor β (TGF- β)의 창상치유에서의 역할과 그 기전에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있고 성장인자 중에서도 TGF- β 3가 창상치유시에 결체조직의 증식, 골 전도와 함께 후반기에 반흔조직의 감소에도 기여한다는 보고들이 있다. 저자는 구개 결손부의 수술시에 외부에서 TGF- β 3를 투여함으로써 창상치유에 어떤 영향을 미치는지를 관찰하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구재료

가. 실험동물

실험동물로는 230g내외의 Sprague Dawley백서 모체들로부터 초산 출생한 새끼 155마리 중 대조군으로 일체의 수술을 시행하지 않고 사육한 정상군 20마리를 제외한 135마리에서 출생 2주(95마리)와 출생 4주(40마리)에 각각 구개점막조직 및 하부골을 포함한 구개 결손부를 수술로 형성하였다. 형성된 구개 결손부를 봉합하는 수술방법에 따라 통법(Von Langenbeck Technique)의 수술군, 피부이식군, 배양상피조직이식군으로 분류하였다. 모든 실험동물들은 4주까지는 모체와 함께 사육하였고 6주부터는 암수를 구분하여 Cage당 50~60마리씩 일정온도와 습도하에서 정상사료와 물로 10주까지 사육하였으며 각 실험군의 암수는 동수로 하였다.

나. 상피조직 배양 배지

상피조직 배양을 위해 다음과 같은 배지가 사용되었다.

P 배지 : Dulbecco's Modified Eagle Mesium(DMEM, GIBCO BRL, Grand island, N.Y., USA), F-12 nutrient mixture(GIBCO BRL, Grand island, N.Y., USA), 3.07g/l NaHCO₃(Duksan Pharma. Co. Korea), 0.475g/l L-glutamine (GIBCO BRL, Grand island, N.Y., USA)

F 배지 : P 배지 + 10% Fetal bovine serum(Hyclone, Logan Utah, USA)

+ amphycillin(Sigma chemical Co. St. Louis, USA)

E 배지 : F배지 + 0.4 μ g/ml hydrocortisone, 5 μ g/ml insulin (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany), 0.1 μ g/ml cholera toxin, 5 μ g/ml human transferrin(Sigma chemical Co. St. Louis, USA), 2 μ g/ml 3'-5-triiodo-L-thyronine, 5ng/ml human epidermal growth factor(Sigma chemical Co. St. Louis, USA)

다. 실험약제

recombinant human TGF- β 3

동결건조된 recombinant human TGF- β 3 (R&D systems Inc. USA)

를 1mg/ml Bovine Serum Albumin(BSA)를 함유한 sterile 4mM HCl 용액에 재조성하여 30ng과 150ng씩 각각 나누어 사용하였다.

2. 연구 방법

가. 수술시기 및 방법

1) 정상군

백서의 상악골의 정상적인 성장을 관찰하기 위하여 대조군으로 20마리를 수술적 조작 없이 정상사육하였으며 출생 4주, 6주, 8주에 럼폰과 케타라 혼합마취(Xylazine Hcl 10mg/kg +Ketamine 90mg/kg)하에 polyether인상재로 구개면을 인상채득하고 10주에 희생하여 성장을 계측하였다.

2)출생 2주 구개결손부 형성군

출생후 구개열과 유사한 환경을 인위적으로 형성하기 위하여 백서 77마리에서 출생 2주에 럼폰과 케타라 혼합(Xylazine Hcl 10mg/kg +Ketamine 90mg/kg) 복강내마취하에 수술현미경하에서 백서 구개면에 구개중심선을 따라 2~3mm 폭의 구개연조직 및 하부골을 절제한 구개결손부를 형성하였다. 형성된 결손부를 가진 백서를 수술방법에 따라 통법(Von Langenbeck Technique)의 수술군, 피부이식군, 배양상피조직이식군으로 나누어 구개결손부를 봉합수술하였다.

(1) 통법의 수술군

통법의 수술군은 구개결손부가 형성된 백서 23마리에서 Von Langenbeck수술법을 이용하여 구개양측의 치조부를 따라 절개하여 거상 견인한 구개양측피판으로 현미경하에서 10-0 nylon을 이용하여 일차봉합을 시행하고 피브린 접착제를 상부에 도포하였다(Fig.1, 2 참조). 수술한 23마리 중 18마리는 출생 4주, 6주, 8주에 정상군과 같은 방법으로 인상 채득하고 10주에 희생하여 성장을 계측하였으며 나머지는 수술 1주, 2주, 3주, 4주, 6주에 희생하여 조직학적 관찰을 시행하였다.

(2) 배양상피조직이식군

① 상피의 일차 배양

Feeder layer를 제조하기 위하여 백서 섬유모세포에서 유래한 swiss 3T3 fibroblast를 F배지에서 배양하여 80~90% 정도로 자라던 0.4mg/ml mitomycin C(Sigma chemical Co. St. Louis, USA) 150 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 처리하였다. 이를 다시 phosphate buffered saline(PBS)로 세척하고 trypsin / EDTA(GIBCO BRL, Grand island, N.Y., USA) 처리하여 각 배양접시에 5 \times 10⁵/100mm dish 개의 세포를 분주하여 상피의 일차배양을 위한 feeder layer로 이용하였다. 상피의 일차배양을 위하여 출생 1일된 백서의 등에서 채취한 조직을 PBS로 3회 이상 세척하고 1~2mm 크기로 잘게 잘라 0.15% collagenase-dispase(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)를 1시간 처리하였다. 입체현미경하에서 상피와 결체조직을 핀셋으로 분리한 후 상피는 0.25% trypsin/versene 용액에 20분간 처리하여 원심분리하였다. 상피세

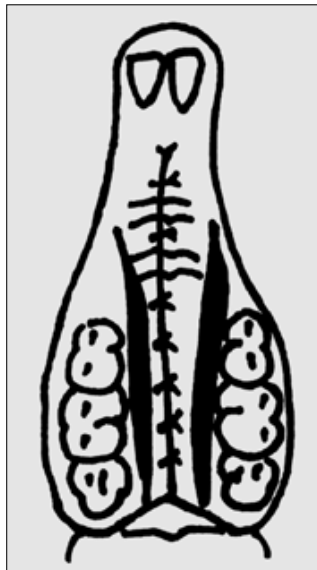


Fig. 1

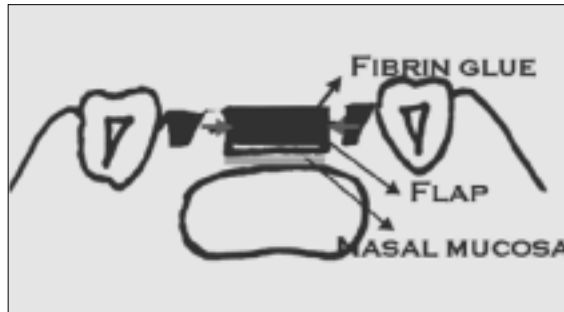


Fig. 2

Fig. 1, 2. Conventional surgery (Von Langenbeck technique) group.

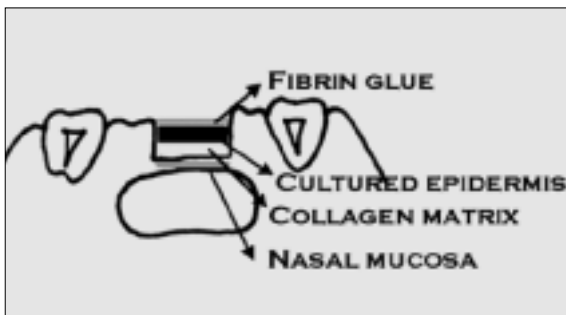


Fig. 3. Cultured epidermal tissue graft group.

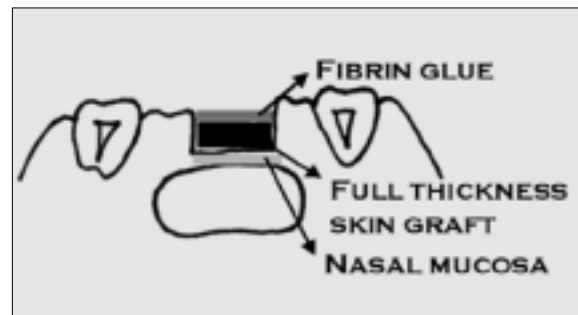


Fig. 4. Skin graft group.

포를 모아 feeder layer에 분주하고 배지는 E 배지를 이용하였다. 배지는 2일마다 교환해주며 6일간 배양하였다.

② 입체 배양

상피조직의 삼차원 재건을 위하여 제 1형 교원질(Nitta Gelatin Co., Osaka, Japan)과 reconstitution buffer(2.2g NaHCO₃, 4.77g HEP-ES, 0.05N NaOH 100ml), 10×P 배지를 swiss 3T3 fibroblast(1×10⁶/ml)와 혼합하여 200 μ l 씩 12mm millicell(Millipore Co., Bedford, USA)에 넣어 37°C에서 중화시켜 하부결체조직을 형성하였다. collagen gel 상부에 일차배양에서 배양된 상피세포(3×10⁵/ml)를 E 배지와 함께 균주한 후 3일후 air-liquid condition으로 바뀌준 후 2일마다 주변배지를 바꿔 주면서 7일간 배양하였다.

③ 배양상피조직 이식

배양상피조직이식군은 구개결손부가 형성된 백서 25마리에서 삼차원 세포배양된 자가상피조직을 구개결손부에 이식하고 그 하부는 우골에서 채취한 상용 콜라젠으로 갈아주고 상피상부는 피브린접착제를 도포하였다(Fig. 3 참조). 수술한 25마리 중 18마

리는 출생 4주, 6주, 8주에 정상군과 같은 방법으로 인상 채득하고 10주에 희생하여 성장을 계측하였으며 나머지는 수술 3일, 5일, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주에 희생하여 조직학적 관찰을 시행하였다. 이와 별도로 배양상피조직의 생착을 확인하기 위하여 음성 대조군(negative control)으로 구개결손부가 형성된 백서 4마리에서 배양조직의 이식 없이 구개결손부의 하부는 우골에서 채취한 상용 콜라젠으로 갈아주고 상부는 피브린접착제를 도포하여 술 후 3일, 1주에 희생하여 조직학적 관찰을 시행하여 배양조직이식군과 비교하였다.

(3) 피부이식군

피부이식군은 구개결손부가 형성된 백서 25마리에서 구개결손부에 백서의 등에서 채취한 전층피부피판을 이식하고 상부는 피브린접착제를 도포하였다(Fig. 4 참조). 수술한 25마리 중 20마리는 출생 4주, 6주, 8주에 정상군과 같은 방법으로 인상 채득하고 10주에 희생하여 성장을 계측하였으며 나머지는 수술 1주, 2주, 3주, 4주, 6주에 희생하여 조직학적 관찰을 시행하였다.

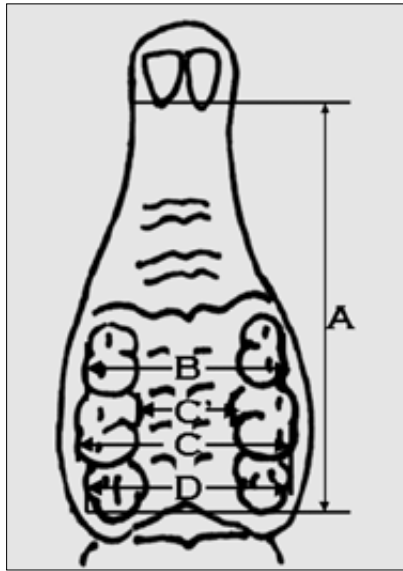


Fig. 5. Measurement points

- A : Length from incisal cingulum to distal end of the last molar
- B : Width between buccal surfaces of first molars
- C : Width between buccal surfaces of second molars
- C' : Width between palatal surfaces of second molars
- D : Width between buccal surfaces of third molars

3) 출생 4주 구개결손부 형성군

수술방법에 따른 상악골의 성장의 차이가 수술시기를 달리 할 경우에 그 변화가 있는지를 알아보기 위하여 백서 40마리에서 출생 4주에 구개결손부를 외과적으로 형성하고 통법의 수술군과 피부이식군으로 수술방법을 나누어 봉합수술하고 정상군과 함께 성장양상을 비교 관찰하였다. 통법의 수술군은 출생4주에 구개결손부를 형성한 백서 20마리에서 출생 2주 수술군과 같은 방법으로 수술한 후 출생 6주, 8주에 인상 채득하고 10주에 희생하여 성장을 계측하였다. 피부이식군은 출생4주에 구개결손부를 형성한 백서 20마리에서 출생 2주 수술군과 같은 방법으로 수술한 후 출생 6주, 8주에 인상 채득하고 10주에 희생하여 성장을 계측하였다.

4) TGF-β3 투여군

구개결손부 봉합후의 치유과정에서 TGF-β3의 효과를 관찰하기 위하여 출생 2주된 백서 18마리를 동일한 방법으로 구개결손부를 형성한 후 통법의 수술군과 배양상피조직이식군으로 각각 9마리씩 나누어 수술시에 구개결손부에 collagen matrix를 깔고 recombinant human TGF-β3를 투여한 후 통법의 수술군은 상부를 견인한 양측 피판으로 봉합하고 배양상피조직이식군은 배양상피조직으로 덮어준 후 피브린접착제를 도포하였다. 두 군에서 각각 TGF-β3를 30ng(5마리), 150ng(4마리)으로 농도를 달리 하여 투여하였으며 슬후 3일, 1주, 2주, 3주, 4주에 각각 희생하여 조직학적 관찰을 시행하였다.

나. 실험동물의 희생

정상군은 10주에 모두 에테르로 마취하여 희생시킨 후 상악골을 적출하여 10% 중성 포르말린용액에 고정하였다. 각 수술군들도 정상군과 마찬가지로 성장계측을 시행한 동물은 10주에 모두 희생하였으며 나머지는 각 시기별 치유과정을 조직학적으로 관찰하기 위하여 시기별로 희생하였다.

다. 성장 계측

정상군, 출생 2주 및 4주 수술군 모두에서의 상악골의 성장을 계측하기 위하여 5개의 계측점을 설정하고 4, 6, 8주에 인상채득하여 제작된 석고모형상에서, 10주는 적출한 조직에서 상악골의 폭과 길이성장을 계측하였다(Fig. 5 참조).

라. 표본 제작

1) H-E 염색

고정된 조직을 증류수에 20분 정도 세척한 후 ethyl alcohol로 탈수하고 xylene으로 세척하여 파라핀에 포매한 후 5~8μm의 박절표본을 제작하고 통법에 따라 xylene에 의한 탈 파라핀 과정, ethyl alcohol 함수 과정 및 수세과정을 거쳐 hematoxylin과 eosin에 중염색하여 광학현미경으로 검경하였다.

2) Masson Trichrome 염색

H-E 염색시와 동일부위의 박절표본을 H-E 염색과 동일과정으로 함수 및 수세과정을 거친 후 Biebrich scarlet acid fuchsin, phosphomolybdic acid - phosphotungstic acid, aniline blue, light green, 1% acetic acid로 중염색하여 광학현미경으로 검경하였다.

III. 연구 결과

1. 성장 계측

정상군, 2주 수술군에서 4주, 6주, 8주, 10주에 각 계측점의 성장을 계측하고 4주 수술군은 6주, 8주, 10주에 각 계측점의 성장을 계측하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 2주수술군에서 모든 계측항목에서 모든 시기에서 정상군은 수술군에 비해 상악골의 성장이 컸으며 피부이식군과 배양상피조직이식군은 통법의 수술군에 비해 상악골의 성장이 더 크게 나타났다. 4주수술군 역시 2주 수술군과 같은 결과를 얻었으며 피부이식군과 통법의 수술군 모두에서 전반적으로 2주수술군에 비해 성장이 좀 더 크게 나타났다. 2주 및 4주수술군 모두에서 정상군, 배양상피조직이식군, 피부이식군, 통법의 수술군의 순서로 상악골의 성장이 일어난 결과에 대해 통계학적으로 의의가 있는지를 알아 보기 위하여 계측항목별로 repeated measured ANOVA test, multiple comparison (Duncan's test)을 시행하였다.

통계분석결과 2주수술군에서는 모든 계측항목에서 정상군과 통법의 수술군 간에는 유의한 차이가 있었으며(P<0.0001) 3개의 계측항목(C'의 10주, D의 6주, 8주 계측)을 제외한 모든 계측항목의 모든 성장시기에서 배양상피조직이식군과 통법의 수술군 간

에는 유의한 차이를 보였다(P<0.0001) (Table 1, Fig. 6 참조).

4주수술군에서는 계측점 A의 6주 계측을 제외한 모든 계측항목에서 정상군과 통법의 수술군 간에는 유의한 차이가 있었으며 (P<0.0001), 계측항목 C의 10주, C', D의 8주 및 10주계측에서 피부 이식군과 통법의 수술군 간에는 유의한 차이를 보였다(P<0.0001) (Table 2, Fig. 7 참조).

2. 육안 소견

통법의 수술군은 술후 2주부터 반흔 형성을 관찰할 수 있었고 (Fig. 8 참조) 두꺼게 증식되었던 구개 양측의 육아조직은 술후 3주를 경과하면서 감소하였으나 구개 양측의 반흔조직은 출생 10주 회생시기까지 지속되었다(Fig. 9 참조).

배양상피조직 이식군에서 배양한 상피조직을 구개열부위에 이식한 모든 이식편이 모두 생착하였음을 1주후 육안소견으로 관찰할 수 있었다(Fig. 10 참조).

배양상피조직의 생착을 비교하기 위해 구개 결손부에 배양상피 없이 collagen matrix와 피브린접착제만을 도포한 음성 대조군을 설정하고 조직학적으로 관찰한 결과 3일 및 1주에서 배양상피조직의 이식과는 상이한 결과를 얻었다. 대조군은 3일에는 육안상으로 상피를 관찰할 수 없었고 1주 소견에서도 상피화가 불완전하게 일어났으며 구개결손부위는 함몰되어 있었고 완전한 상피화가 일어나지 못하였다(Fig. 11 참조). 반면 배양상피조직을

이식한 군에서는 술후 3일에 비록 함몰된 형태이지만 생착한 배양상피를 구개 결손부에서 관찰할 수 있었고 술후 5일에는 함몰되었던 결손부가 거의 원래의 두께를 되찾으면서 상피화가 일어나 있었다. 술후 1주에 이식한 조직편이 완전히 생착한 것을 확인할 수 있었고 이식부위가 완전한 상피화를 이루며 함몰된 소견은 없었으며 육안소견으로 주위상피층과 차이를 구별할 수 없었다. 술후 2주에 구개 중심선을 따라 가는 실선모양의 반흔조직이 관찰되었으나 4주를 경과하면서 미미해졌으며 회생시에도 특별한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 12 참조). 피부이식군은 전체적으로 배양조직 이식군과 같은 소견을 보였고 다만 술후 2주에 구개 중심부가 배양상피조직 이식군에 비해 눈에 띄게 두꺼워졌다가 술후 4주에는 원래의 두께를 되찾았으며 회생시에 배양상피조직이식군과 유사한 소견이었다(Fig. 13 참조).

3. 광학 현미경 소견

(1) 통법의 수술군

통법의 수술군은 술후 1주를 경과하면서 양측 골노출부의 상피화가 급속히 일어나기 시작하고 술후 2주에는 구개결손부와 양측골노출부위 상피 하방으로 결체조직층이 뚜렷하게 증식하였다(Fig. 14 참조). 술후 4주에 이르러 결체조직층은 매우 치밀한 교원섬유의 재배열이 일어났고 양측 골노출부위에 교원섬유는 치아에서 구개 결손부방향으로 수평으로 배열되어 있었다(Fig.

Table 1. Growth of 2-week surgery group

		postnatal 4weeks	6weeks	8weeks	10weeks
A	NORMAL(n=20)	15.44±0.39	18.18±0.52	19.42±0.54	20.22±0.44
	CULTURE(n=18)	15.35±0.37	17.9 ±0.34	18.73±0.51*	19.4 ±0.65*
	GRAFT(n=20)	14.89±0.35*†	17.52±0.37*†	18.57±0.53*	19.27±0.49*
	SURGERY (n=18)	14.58±0.55*†	17.03±0.69*†	18.26±0.55*†	18.92±0.57*†
B	NORMAL	8.39±0.16	8.93±0.2	9.19±0.27	9.36±0.38
	CULTURE	8.21±0.31*	8.54±0.27*	8.67±0.27*	8.87±0.34*
	GRAFT	8.15±0.21*	8.47±0.18*	8.68±0.26*	8.8 ±0.26*
	SURGERY	7.95±0.25*†	8.21±0.18*†	8.41±0.22*†	8.48±0.26*†
C	NORMAL	8.6 ±0.15	9.12±0.16	9.39±0.2	9.65±0.37
	CULTURE	8.36±0.26*	8.72±0.24*	8.93±0.29*	9.01±0.32*
	GRAFT	8.29±0.23*	8.65±0.19*	8.89±0.26*	8.96±0.25*
	SURGERY	8.14±0.27*†	8.46±0.21*†	8.69±0.21*†	8.74±0.21*†
C'	NORMAL	4.45±0.09	4.71±0.17	4.95±0.15	5.07±0.12
	CULTURE	4.09±0.26*	4.23±0.28*	4.33±0.26*	4.43±0.31*
	GRAFT	4.14±0.15*	4.24±0.16*	4.34±0.22*	4.56±0.28*
	SURGERY	3.94±0.26*†	4.08±0.22*†	4.16±0.21*†	4.36±0.23*
D	NORMAL	8.68±0.17	8.94±0.21	9.15±0.27	
	CULTURE	(impaction of	8.35±0.25*	8.58±0.29*	8.81±0.38*
	GRAFT	3 rd molars)	8.25±0.23*	8.48±0.26*	8.67±0.21*
	SURGERY		8.22±0.27*	8.48±0.25*	8.49±0.28*†

* : significantly different from Normal group at P<0.0001 level

† : significantly different from Culture group at P<0.0001 level

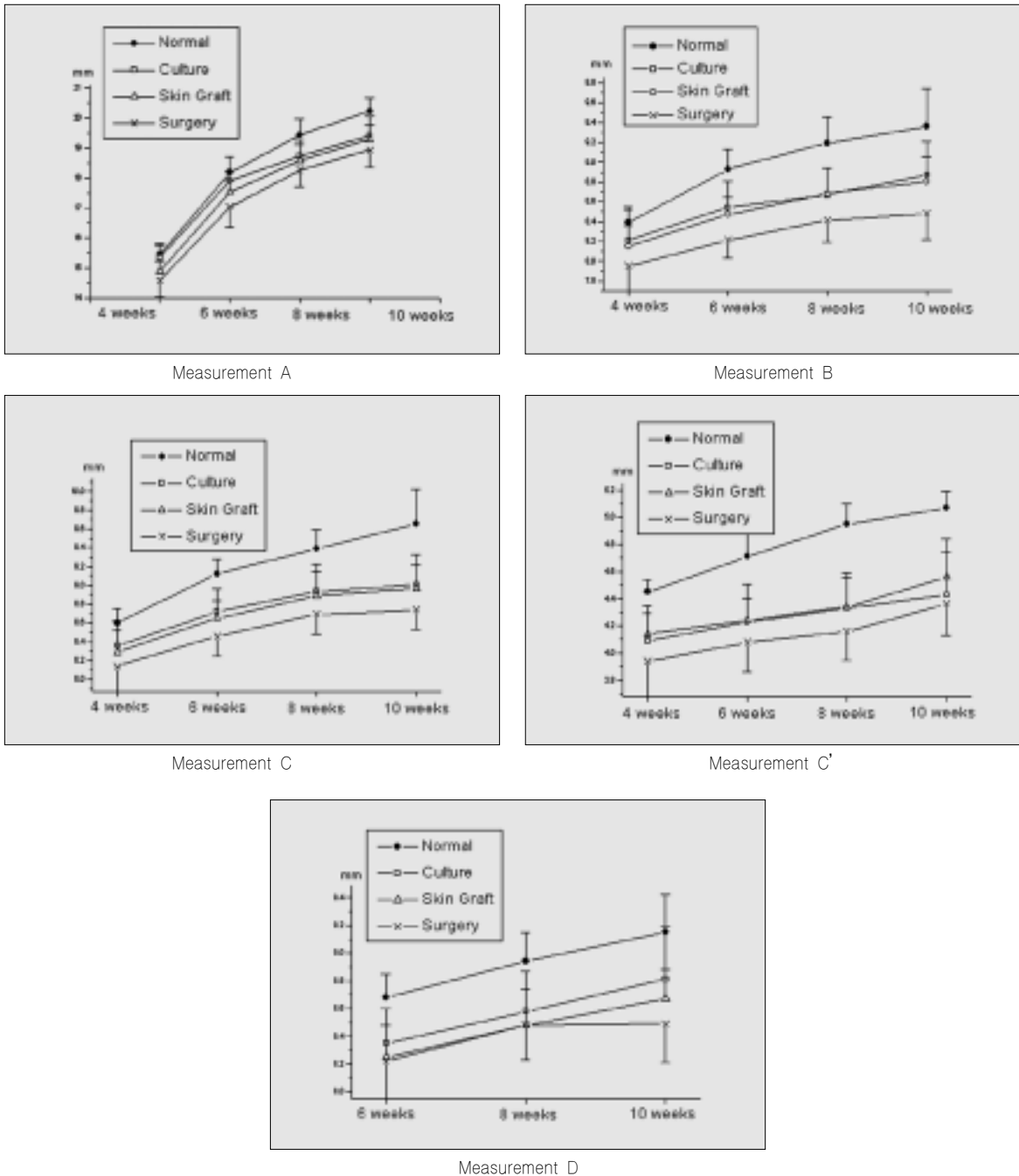


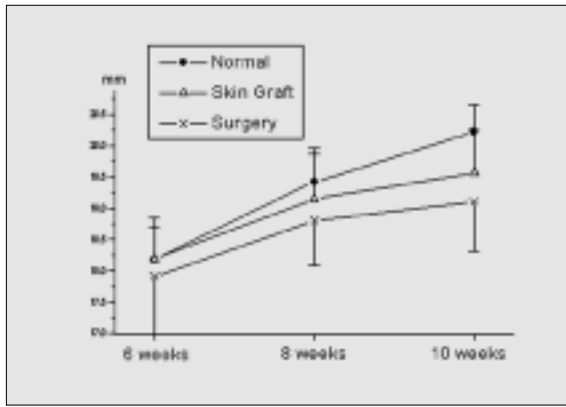
Fig. 6. Comparison of growth in 2-week surgery group.

15 참조). 이러한 소견은 배양상피조직 이식군의 치아 주위 구개부의 교원섬유의 배열과는 분명한 차이가 있었다(Fig. 16 참조). 통법의 수술군의 교원섬유의 치밀한 수평배열은 희생된 시기까지 유지되었다(Fig. 17 참조).

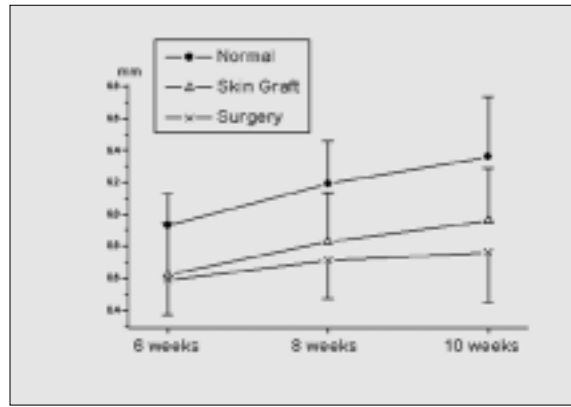
(2) 배양상피조직 이식군

술후 3일에는 주위상피층의 증식과 아울러 배양상피가 결손부 상연에 1~2층씩 배열되어 있었고 술후 5일에는 결손부 중심부에서 배양상피가 증식하면서 3~4층을 이루고 있었으며 결손부

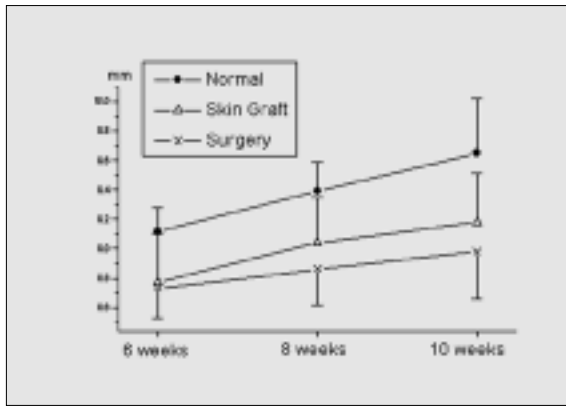
에 전체적으로 상피층이 두꺼워져 있었다(Fig. 18 참조). 술후 1주에는 기저층에서부터 각화층까지 완전한 형태를 갖추며 배열되어 있었으며 주위 상피층과 조직학적으로 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 19 참조). 반면 대조군에서는 술후 1주에서도 결손부 전체의 완전한 상피화가 일어나지 않았으며 상피층도 2~3층으로 함유된 소견이었다(Fig. 20 참조). 배양상피조직 이식군에서는 술후 2주부터 구개 결손부 상피층 하방으로 결체조직층이 뚜렷하게 증식하였다(Fig. 21 참조). 육안소견으로도 술후 2주부터 구개 정중선을 따라 조직이 용기된 소견을 보여 피부이식군과 유사한



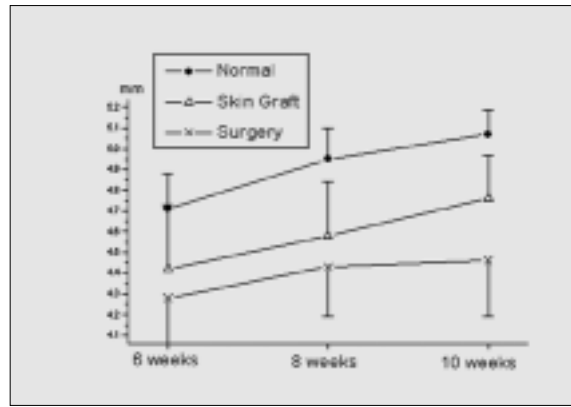
Measurement A



Measurement B



Measurement C



Measurement C'

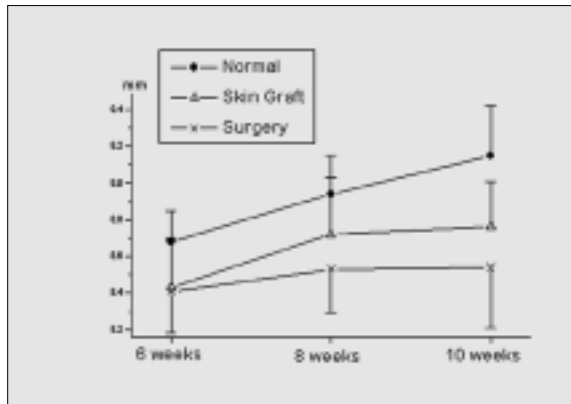
Table 2. Growth of 4-week surgery group

	postnatal 6weeks	8weeks	10weeks
NORMAL(n=20)	18.18±0.53	19.42±0.54	20.22±0.44
A GRAFT(n=20)	18.19±0.66	19.15±0.71	19.56±0.7*
SURGERY(n=20)	17.91±0.92	18.8±0.72 *	19.1±0.79*
NORMAL	8.93±0.2	9.19±0.27	9.36±0.38
B GRAFT	8.62±0.33*	8.83±0.31*	8.96±0.33*
SURGERY	8.59±0.22*	8.71±0.24*	8.76±0.31*
NORMAL	9.12±0.16	9.39±0.2	9.65±0.37
C GRAFT	8.77±0.33*	9.04±0.31*	9.18±0.33*
SURGERY	8.73±0.2*	8.86±0.24*†	8.98±0.32*
NORMAL	4.71±0.17	4.95±0.15	5.07±0.12
C' GRAFT	4.42±0.31*	4.58±0.26*	4.76±0.21*
SURGERY	4.28±0.22*	4.43±0.24*†	4.46±0.27*†
NORMAL	8.68±0.17	8.94±0.21	9.15±0.27
D GRAFT	8.43±0.27*	8.72±0.31*	8.76±0.25*
SURGERY	8.41±0.23*	8.53±0.24*†	8.54±0.33*†

* : significantly different from Normal group at P<0.0001 level

† : significantly different from Graft group at P<0.0001 level

소견이었으나 용기정도는 피부이식군에 비해 좁고 낮았다. 술후 4주에 구개 결손부 하방으로 뚜렷하게 증식하였던 결체조직층은 술후 6주, 8주를 경과하면서 감소하였다. 술후 3주부터 구개



Measurement D

Fig. 7. Comparison of growth in 4-week surgery group.

결손 변연부의 골단으로부터 골막의 비후와 신생골 형성의 소견을 보였으며 술후 4주에 보다 분명하였으며 통법의 수술군에 비해 구개 결손 중심부로의 신생골의 형성이 더 빨리 일어나는 소견을 보였다(Fig. 22 참조).

(3) 피부이식군

술후 1주에 이식한 조직편이 생착한 것을 확인할 수 있었고 술후 2주부터 구개 결손부 하방으로 결체조직층이 뚜렷하게 증식하였다. 육안소견으로도 술후 2주부터 구개 결손부 정중선을 따

라 조직이 용기된 소견을 보였고 술후 4주에 이르러 용기하였던 조직은 광학현미경소견상 결체조직의 두께가 감소하면서 완만하여졌다. 술후 6주부터 trichrome 염색 소견상 collagen의 밀도가 감소하는 소견을 보였다.

(4) TGF- β 주입군

술후 3일과 1주에 다른 군과 구별되게 구개 결손부의 결체조직층과 골막주위에 높은 세포 밀도가 관찰되었다(Fig. 23 참조). 이러한 소견은 술후 3주에 이르러서는 감소하는 경향을 보였으나 다른 군과는 여전히 차이가 있었다. 술후 2주부터 신생골의 빠른 형성이 관찰되었으며 술후 3주에는 이미 양측 골단이 연골조직으로 유합되는 소견을 보여 다른 군과는 골형성속도에 있어 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 24 참조). 술후 4주에 이르러서도 다른 군에 비해 결체조직층이 여전히 두껍고 Trichrome 염색소견상 구개 중심부 하부에 collagen의 진한 염색상이 관찰되었다. 30ng 투여군과 150ng 투여군사이에 조직학적으로 확실한 차이는 발견되지 않았으나 30ng 투여군보다는 150ng 투여군에서 결체조직과 골막 주위세포의 증식이 뚜렷하였고 신생골의 형성속도도 좀 더 빠른 소견이었다. 통법의 수술을 시행하고 성장인자를 투여한 군이나 배양상피조직 이식과 함께 투여한 군 모두에서 이와 같은 소견을 보였고 두 군이 각각 성장인자를 투여하지 않았던 군과는 분명한 차이가 있었다. 즉 결체조직층과 골막주위의 높은 밀도의 세포집락과 증식, 결체조직의 활발한 증식, 빠른 골재생의 소견을 보였다. 통법의 수술과 함께 성장인자를 투여한 군에서는 구개 양측에 노출된 골면 상부로 두꺼운 결체조직을 형성하고 술후 4주까지 유지되었으나 섬유의 주행방향은 성장인자를 투여하지 않은 통법의 수술군에 비해 뚜렷하지 않았다(Fig. 15, 25 참조).

IV. 총괄 및 고찰

구순구개열환자의 안면부 성장에서 특히 상악골은 정상인에 비해 전방 및 하방 성장, 폭경성장이 제한적인 것으로 알려져 있다²⁰. 구순구개열의 상악골의 열성장은 구순구개열의 유전적 요인 뿐만 아니라 구순구개열의 수술시기, 수술방법, 치조열 골이식이나 교정치료의 시기나 방법 등의 여러 요인이 기여한다고 보고되고 있다. 그 중에서도 구순구개열의 수술후 반흔조직에 의한 조직의 긴장이 중요한 한 기여요인이라는 점에 많은 학자들이 동의하고 있다. 상악골의 비정상적인 발육을 보이는 이유를 Ross는 3가지의 요인, 즉 내인성(intrinsic) 발육부전, 이환측 및 비이환측 모두의 악골의 위치와 성장에 영향을 미치는 기능적 변형, 수술에 의한 외인성(iatrogenic)요인으로 분류하면서 내인성 요인이나 기능적 요인보다 수술에 의한 외인성 요인이 중간면의 성장 결핍에 더 큰 영향을 미친다고 보고하였다⁹. 임상적인 결과 뿐만 아니라 여러 차례의 동물 실험을 통해서도 구개열의 수술과 구순열의 수술후 조직의 긴장이 상악골의 전방 성장 및 구개부의 폭경성장에 제한을 가한다는 결과가 여러 학자들에 의해 보고된 바 있다. Bardach는 일련의 동물실험을 통해 구순구개

열수술후 상악골의 성장 장애를 보고하였고^{8,9}. Kremenak은 구개부 양측의 판막을 거상하여 골면을 노출시키는 것만으로도 상악골의 성장이 저해됨을 보고하였으며⁷ Wijdeveld는 Von Langenbeck의 수술법을 동물에 적용하였을 때 반흔조직에 의해 상악골의 측방 성장이 저지된다고 하였다¹⁰. 즉 구개부 양측의 노출된 골면위로 형성되는 반흔조직의 섬유들이 치아의 Sharpey's fiber와 붙어 수평으로 배열되어 반흔조직에서 가해지는 장력이 치아를 내측방향으로 당긴다고 하였고 Leenstra 역시 같은 결과를 보고하면서 구개부 양측의 노출된 골면을 만들지 않는 변형된 수술방법을 주장하였다¹¹. Jonsson등은 동물실험에서 구개부의 양측을 나누어 피부이식을 한 쪽이 골면을 노출시킨 쪽보다 구개 결손부의 치유가 양호함을 보여 주었다¹². 지난 50년간 구개열환자의 수술후 상악골이 협소해짐을 보고한 많은 연구가 있어 왔다. 이러한 창상 치유과정에서의 반흔조직이 성장에 미치는 영향에 대해 Ross는 치조골의 측방 성장이 수술 직후에는 창상 수축에 의해, 그 이후에는 반흔조직의 장력에 의해 영향을 받는다고 하였으며 교정치료에서 상악골을 넓히는 데도 반흔조직이 장애요인으로 작용한다고 하였다¹³. 임상적인 연구에서도 Ishikawa는 상악골의 성장 제한의 정도는 반흔조직의 분포와 밀접히 연관되어 있다고 하였다¹⁴. 이러한 반흔조직에 의한 상악골 성장의 영향을 최소화하기 위해 최근에는 동물실험에서 구개 양측의 골노출표면에 atelocollagen matrix이나 poly-(L-Lactic) Acid membrane을 식립하여 반흔조직을 감소시키려는 시도가 있었다^{15,16}. 반흔조직의 상악골 성장에 미치는 영향에 대한 기존의 임상 및 동물실험의 결과를 바탕으로 하여 본 연구는 백서에서 구개열에 대한 통상적인 수술방법이 상악골의 성장발육에 영향을 미치는지를 알아보고 수술후 조직의 긴장을 최소화하기 위한 대체적 수술방법으로 피부 이식이나 자가배양조직의 이식이 상악골을 정상 성장하는데 기여할 수 있는지를 알아 보고자 하였다.

성장 연구와 관련한 동물실험에서 적절한 동물모델의 선택은 중요한 문제로 지적되어 왔다^{9,17,18}. 구개열과 관련한 기존의 동물 실험에서 여러 동물이 사용되어 왔고 실험동물의 종류, 나이, 수술시기, 수술방법등에 따라 다양한 결과가 보고되었고 이 중에는 서로 상반된 결과를 보이는 보고도 있다. 기본적으로 동물에서의 중간면의 성장양상은 인간에서의 성장과는 차이가 있기 때문에 성장양상과 관련한 동물실험모델은 한계가 있다. 이런 관점에서 볼 때 인간과 유사한 중간면 성장을 보이는 침팬지와 같은 동물모델이 유용하다고 하였지만 백서나 가토와 같은 동물 역시 이러한 실험에 유인원류보다 경제적인 대체동물모델이 될 수 있다고 하였다^{9,17,19}. 또한 본 실험에서는 실험내용에 포함되어 있는 조직 배양 및 이식과 transforming growth factor- β 투여에 대한 기존의 연구에서 배양방법, 실험방법 및 연구결과가 백서를 동물모델로 하여 많이 이루어졌고 축적되어 있는 점을 고려하여 백서를 동물모델로 선택하였다.

구순 및 구개열에 대한 동물모델을 만들기 위한 방법으로는 배내에서 외과적 절제를 통해 구순구개열을 유발하는 방법, retinoic acid나 beta-aminopropionitrile (BAPN)과 같은 약물을 임신기간 중 모체에 투여하여 구순구개열을 유발하는 방법, 출생

초기에 외과적 절제를 통해 구순구개열을 만드는 방법들이 알려져 있다. 예비실험을 통해 백서에서 앞서 소개된 동물모델을 실험해 본 결과 배내수술을 통한 방법은 출생시에 구순구개열을 가지고 태어난다는 장점이 있지만 사망률이 높고 배내수술시 구순구개열의 일정한 폭을 얻기가 어렵고 출생시에 이미 파열부위의 상당한 유합이 일어나는 단점이 있었다. 구개열을 유발하는 약물의 투여는 구개열 이외에도 전신적인 기형이 함께 유발되어 본 연구의 모델로는 부적합하였고 백서는 출생후 식이의 어려움으로 장기적인 성장 관찰이 불가능하였다. 출생 후 외과적으로 구개열을 만든 모델은 유전적으로 정상적인 동물이란 점과 태아 단계에서의 구개열의 성장과정을 밟지 않았다는 점, 수술로써 유발하는 구개열은 전형적인 구개열을 완전히 재현할 수 없다는 단점은 있지만 구개열에서 나타날 수 있는 여러 기여요인을 최소화할 수 있어 연구결과가 다른 요인의 영향을 상대적으로 덜 받을 수 있다는 장점이 있어 본 실험의 모델로 선택되었다. 출생 직후에 일차적으로 구개열을 외과적으로 유발하고 구개열의 9~12개월에 해당하는 백서의 안면부의 성장연령인 출생 2주에 구개열에 대한 일차봉합술을 시행하고자 하였으나 출생 직후의 수술에 의한 생리적 외상이 너무 크고 식이의 어려움으로 조기 사망률이 높아 출생 2주에 구개결손부를 형성한 후 이에 대한 일차봉합을 동시에 시행하였다.

구개열과 유사한 구개 결손부를 외과적으로 형성하고 Von Langenbeck 수술법으로 수술을 시행해 본 결과 정상군에 비해 상악골의 길이와 폭경 성장이 작은 것으로 나타나 기존의 많은 보고에서와 같은 결과를 얻었다. 성장계측 결과 통법의 수술군에서는 성장을 비교한 4주에서 10주에 이르기까지의 모든 계측치에서 정상군에 비해 통계적으로 유의하게 지속적인 열성장을 보였다($P<0.0001$, Table 1 참조). 정상군에 비해 수술군이 성장에 있어 차이를 보이는 것은 기존의 연구에서도 밝혔듯이 일차적으로는 수술에 의한 외상, 식이의 어려움, 상악골 구개부의 창상 수축 등의 여러 요인들이 작용했으리라 추측된다. 그러나 성장의 추이를 관찰할 때 성장 초반기보다는 후반기로 갈수록 정상군의 성장과의 격차가 커지고 성장곡선이 둔화되는 양상을 보이는 것은 후기로 갈수록 수술에 의한 초기의 외상보다는 반흔조직 및 주위조직의 긴장에 의한 영향이 더 많이 관여하는 것으로 보인다. 이러한 점은 육안소견 및 조직학적 관찰에서 성장 후반기에 통법의 수술군에서 반흔조직의 형성과 창상부위의 결체조직의 성숙화가 뚜렷했다는 점에서도 반증된다(Fig. 8, 9, 14, 15, 17 참조). 기존의 동물실험결과에서는 통법의 수술군이 피판을 견인하여 구개결손부를 봉합함으로써 구개열 양측에서 골면이 노출되고 그 상부를 이차유합(secondary intention)에 의한 반흔조직으로 치유됨으로써 상악골의 성장이 저해되었다고 지적하고 있다. 본 연구에서는 이러한 관점에 기초하여 구개부의 양측에 골면을 노출하지 않고 구개결손부를 직접 배양상피조직으로 이식하였을 때 상악골의 성장을 비교관찰하고자 하였다.

최근에는 생체조직공학(Tissue engineering)의 임상적 적용에 대한 시도가 활발히 이루어지고 있다. 이 분야가 발전하게 된 동기는 종양이나 외상, 선천성 기형에 의해 결손된 부위를 동종이

식의 면역학적 거부의 가능성과 아울러 자가조직의 채취 및 이식에 동반되는 여러 가지의 어려움에서 출발하였다. 생체조직공학의 목표는 생체조직의 대용품을 만들어 이식함으로써 우리 몸의 기능을 유지, 향상, 복원하는데 있다²⁰. 생체조직공학(tissue engineering)이란 용어는 Wolter에 의해 처음 사용되어 현재는 조직의 수복과 형성을 유도하는 세포 및 scaffold material, 생활성 단백질(bioactive peptides)의 복합물질의 가공을 의미하게 되었다²¹. 생체조직공학의 여러 분야 가운데서 조직배양 및 이식분야는 실험실연구단계를 넘어 임상적인 적용이 시도되고 있으며²² 초기의 피부조직의 실험실 배양 및 이식²³에서부터 신경이나 혈관, 근육을 포함한 선택적 조직 배양 및 가공, 치주조직의 재생 및 상아질 재생, 장기배양에 이르기까지 다양한 시도가 이루어지고 있다. 아울러 여러 세포들의 실험실 배양 뿐만 아니라 이러한 특정세포의 분화와 기능에 관여하는 성장인자들, 즉 transforming growth factor- β , bone morphogenetic proteins, fibroblast growth factor 등을 생체조직공학에서 적용하고 그 효과를 보고하고 있다.

생체조직공학의 여러 분야 중 피부조직의 배양 및 이식은 1975년 Rheinwald와 Green에 의해 인간의 상피세포의 성공적인 배양을 보고한 이래 실험실 연구 및 동물실험을 거쳐 현재는 이미 3도 화상환자나 당뇨병등으로 인한 만성 피부궤양환자를 대상으로 임상적으로 적용되고 있다. 이러한 피부조직의 재건을 위해서는 상피의 삼차원적 배양과 이식과 함께 상피층을 지지하는 scaffold가 배양조직의 조작, 조직 강도, 창상 수축, 배양조직의 생착에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그동안 진피대체물로는 collagen matrix, 동종 진피, 합성 폴리머등이 자가상피-인공진피대체물의 형태로 사용되어 왔고 최근에는 자가 상피-진피 복합체의 실험실 배양의 성공이 보고되고 있다²⁴.

생체조직공학이 현재와 같이 발전하기 전에는 일반적으로 광범위한 조직 결손부위를 피부조직 이식을 통하여 반흔조직을 최소화하고 창상치유후 조직의 과도한 긴장을 피하려는 시도가 임상적으로 의학계 여러 분야에서 있어 왔다. 그러나 이러한 방법은 진피를 포함한 전층피부이식일수록, 조직의 결손부가 클수록 공여부에 또 다른 결손을 남기기 때문에 진피를 포함한 이식조직의 채취양에는 제한이 있다. 따라서 배양조직이식이 피부이식에 비교되는 몇 가지의 장점이 있지만 이러한 배양조직이 구개결손부에서 생착이 가능할지, 생착이 된다 하더라도 이러한 시도가 성장의 관점에서 볼 때 어떤 영향을 미칠지에 대해서는 아직 알려진 바 없다. 백서에서의 상피배양 및 이식에 대해서는 이미 여러 문헌에서 보고한 바 있으나^{25,27} 구개열의 동물실험 연구와 관련하여 배양조직의 이식이 적용된 바는 없는 실정이다. 이에 본 연구는 자가상피조직을 백서에서 채취하여 실험실에서 삼차원 배양하여 이를 구개 결손부에 이식하여 그 치유과정과 성장에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

배양조직이식군의 성장을 추적한 결과 통법의 수술군과는 성장에 유의한 차이가 관찰되었다($P<0.0001$, Table 1 참조). 배양조직을 이식하는 방법이 실제로 통법의 수술군에 비해 반흔조직을 줄이고 성장에 기여하는지를 확인하기 위하여 백서의 등에서 채취한 전층 피부를 구개 결손부에 이식하는 피부이식군을 설정하

고 그 성장을 추적한 결과 모든 계측항목에서 배양상피조직 이식군과 피부이식군간에는 성장에 있어서 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 배양조직이식군이 통법의 수술군에 비해 창상치유에서 우월한 결과를 보이며 이는 상악골의 성장에도 기여한 것으로 사료되었다. 그러나 두 군간의 성장에서의 차이는 성장 후기의 조직의 긴장 이외에도 몇 가지 다른 요인들이 작용할 수 있다고 추측되는데, 그 중에서도 수술후 초기의 성장의 차이는 창상의 수축 뿐 아니라 수술의 외상정도도 중요한 몫을 담당하였으리라 사료된다. 수술군은 구개면 전체를 골표면으로부터 박리하여야만 구개열부위의 피판 견인이 가능한 반면 피부이식군과 배양조직이식군은 구개면 전체를 박리할 필요 없이 구개열 주위 변연부만을 노출하여도 이식이 가능하기 때문에 훨씬 비침습적(non-invasive) 수술이 가능했다는 점도 수술후 초기 성장의 차이에서 중요한 영향을 미쳤으리라 사료된다. 이러한 점은 이식을 통한 수술방법이 통상적인 수술방법보다는 훨씬 구개부에 대한 수술의 외상을 줄일 수 있다는 보존적 수술방법임을 암시한다.

수술방법을 달리한 세 군을 성장시기별로 조직학적으로 관찰한 결과 육안적 소견과 일치하는 결과를 얻었다. 통법의 수술군은 술후 2주에서 구개열부위와 양측 골노출부위 하방으로 결체조직의 증식이 뚜렷하였으며(Fig. 14 참조) 술후 4주(출생 6주)에 이르러 반흔조직의 재배열 및 성숙이 trichrome 염색에서 관찰되었으며 양측 골노출부위에서 결체조직의 배열은 치아에서 Sharpey's fiber와 연결되어 구개 결손부방향으로 수평으로 주행하였다(Fig. 15 참조). 구개부 양측의 노출된 골면위로 형성되는 반흔조직의 섬유들이 치아의 Sharpey's fiber와 붙어 수평으로 배열되어 반흔조직에서 가해지는 장력이 치아를 내측방향으로 당긴다고 보고한 기존의 연구^{10,11)}와 동일한 조직학적 결과를 얻었다. 이러한 소견은 치아 인접 구개면에서 결체조직섬유의 밀도가 낮고 골표면에 대해 수직방향의 주행을 보이는 배양조직이식군의 치아인접부 소견과는 뚜렷이 구별되었다(Fig. 16 참조). 또한 성숙한 반흔조직은 구개열부위, 양측 골노출부위에서 모두 관찰되었으나 양측 골노출부위가 보다 뚜렷하였고 술후 8주(출생 10주)까지 존재하였다(Fig. 17 참조). 반면 이식군은 피부이식군과 배양상피조직 이식군 공히 술후 2주에 구개 결손부 상부로 조직이 용기된 소견을 보였으며 피부이식군이 보다 뚜렷하였다. 용기된 조직은 술후 4주(출생 6주)에 하방으로 감소하였으며 결체조직의 두께도 감소하였다. 두 군 모두 술후 2주 이후로 구개 중심선을 따라 가는 띠를 이루며 반흔조직이 나타났으나 술후 8주(출생 10주)로 갈수록 희미해졌다(Fig. 12, 13 참조).

결론적으로 육안 소견 및 조직학적 관찰의 결과를 미루어 볼 때 통법의 수술군과 배양상피조직 및 피부이식군의 반흔조직의 형성 및 성숙의 차이가 상악골의 성장의 차이를 가져오는데 중요한 역할을 한 것으로 보인다. 그러나 배양상피조직 이식군 역시 정상군에 비해 성장이 작은 결과에는 여러 요인들이 기여할 것으로 추측된다. 술후 초기의 수술외상, 식이의 어려움, 성장이 왕성한 시기의 성장부위의 하나인 구개융합부를 포함한 골결손 등이 기여요인으로 추측되며 육안 소견 및 조직학적 소견에서

미미하나마 관찰되는 반흔조직의 형성이 성장의 장애요인으로 작용하였을 것으로 보인다. 본 연구에서는 배양이식조직을 자가 상피-진피복합체로 배양 이식하지 않고 배양상피하방에 collagen matrix를 인공 진피로 하여 이식하였기 때문에 자가 상피-진피복합체 이식에 비해 반흔조직의 형성의 가능성이 더 높다. 향후 구개결손부의 배양조직이 이식될 경우에는 자가 상피-진피 복합체의 배양 및 이식이 보다 바람직할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 한 동물에서 자가 상피 및 진피를 독립 배양하여 복합이식하였으나 실험대상군에서는 모두 자가상피-인공진피대체물로 이식하였다.

2주 수술군에서의 통법의 수술군과 배양조직이식군의 성장의 차이가 수술시기를 달리 하여도 여전히 나타나는지를 확인하기 위하여 출생 4주에 통법의 수술과 피부이식을 시행하여 성장을 추적 관찰하였다. 연구결과 4주 수술군 역시 2주수술군과 유사한 결과를 얻었다(Table 2 참조). 즉 수술군은 모두 성장 후반기로 갈수록 정상군에 비해 유의하게 성장이 작았으며 성장정도는 2주수술과 같이 정상군, 피부이식군, 통법의 수술군의 순서로 나타났다. 성장 후반기로 가면서 피부이식군과 통법의 수술군간의 성장에 유의한 차이가 나타났다. 그러나 본 연구에서 4주에 수술을 시행한 군에서는 전반적으로 2주에 수술한 군에 비해 성장이 좀 더 많이 일어났다. 이는 4주 수술군이 4주까지 구개열이 아닌 정상적인 성장이 허용되었다는 점에서 이미 출생초기의 상당한 안면부의 성장이 일어난 경우에는 수술에 의한 영향이 상대적으로 작을 수 있음을 시사한다. 또한 본 실험에서 사용한 백서는 출생 2주에서 3주사이에 가장 활발한 구개의 폭경 성장을 보이고 출생 3주를 경과하면서 성장 속도가 둔화되는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 이러한 구개의 성장 특성이 4주에 수술한 군이 출생 2주에 수술한 군에 비해 전반적인 상악골의 성장이 좀 더 크게 일어난 결과에 한 요인으로 작용하리라 추측된다.

앞서도 언급한 바 있지만 창상의 치유가 상악골의 성장에 기여하는 중요한 한 요인이라면 구개열에 의한 골결손부가 완전히 치유유합되고 일차봉합한 상피를 포함한 상부 연조직의 반흔조직을 최소화하는 것이 성장에 중요한 기여를 할 것이다. 최근에는 성장인자를 적용하여 창상치유 및 결손 수복을 조절하려는 시도가 생체조직공학의 중요한 한 분야로 자리매김하고 있다. 성장인자 가운데서도 transforming growth factor- β 는 여러 분야에서 가장 흥미있게 연구되고 있는 성장인자이다. TGF- β 는 현재 5개의 isoform이 밝혀져 있고 이 중 인간에게서는 TGF- β 1, 2, 3만이 있는 것으로 알려져 있다. TGF- β 는 발생과정에서 중요한 성장인자로 밝혀져 있고 구개의 발생과정에서도 이차구개의 유합에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{16,29-31)}. 또한 출생후 성장과 창상 치유에도 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있는데, 특히 창상 치유에서 결체조직의 증식, 신생혈관의 형성 및 유입, 염증반응의 조절, 골 전도과정에서 빠질 수 없는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다³²⁻³⁴⁾. 골절의 치유과정에서 TGF- β 는 기질전구세포에서 골모세포, 연골세포, 파골세포로의 분화를 조절하고 자극하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 외인성 TGF- β 를 골절 부위에 투여하면 골절부위의 골모세포의 유입 및 증식을 자극하

여 연골 및 신생골을 유도한다고 하였다^{35,36}. 창상치유과정에서 TGF-β는 결체조직의 증식과 창상 치유를 가속화하는 역할을 하며^{37,40} 창상 1주에서 2주 사이에 가장 활발히 작용하며 창상 후 3주후에도 작용한다고 하였다^{38,41}. TGF-β3는 비교적 최근에 활발히 연구되고 있는 성장인자로 창상 치유에서 TGF-β1, 2와 생물학적 활성과 역할이 유사하지만 창상치유의 후반기에 반흔조직을 줄이는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 아직 그 역할과 작용기전, TGF-β1, 2와의 수용체 공유 및 인자간의 생물학적 차이에 대해서는 확실하게 밝혀지지는 않고 있다⁴².

창상치유과정에서 결체조직의 증식과 조직 인장강도의 증가는 창상에 바람직한 역할을 하지만 과도한 반흔은 기능적 결손을 가져오기 때문에 반흔조직을 줄이기 위한 여러 가지 노력이 경주되어 왔다. 최근의 연구에서는 창상치유과정 초기에 TGF-β 1,2에 대한 중화 항체(neutralizing antibody)를 투여함으로써 인장강도의 감소 없이 반흔을 줄일 수 있다고 하였고^{43,44} 동물실험에서 TGF-β3를 투여함으로써 창상치유에서 반흔조직을 줄일 수 있다고 하였다^{44,45}. 또한 Murata 등은 TGF-β3의 농도를 증가시킴으로써 TGF-β1의 결체조직 증식의 효과를 차단할 수 있다는 결과를 보여 주었다⁴⁶. O' Kane도 TGF-β3/TGF-β1 비율에서 TGF-β3의 상대적인 농도를 증가시키면 반흔 및 섬유화를 줄일 수 있을 수 있다고 하였다⁴⁷.

본 연구에서는 통법의 수술군과 배양상피조직 이식군에 recombinant human TGF-β3를 collagen matrix에 투여함으로써 반흔 형성 및 하부 골전도에 어떤 영향을 미치는지를 알아 보고자 하였다. human recombinant TGF-β3를 농도를 달리 하여 30ng, 150ng을 주입하여 실험한 결과 통법의 수술군 및 배양상피조직 이식군 모두에서 TGF-β3를 사용하지 않은 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 보였다. 통법의 수술군과 배양상피조직 이식군 모두에서 수술 1주의 조직소견에서 상피 및 결체조직층과 절제된 골단 변연부의 골막 주위로 대조군과 비교하여 현저히 높은 세포밀도가 관찰되었다(Fig. 23 참조). 수술 2주에서는 수술군과 배양조직 이식군 모두에서 구개열부위의 결체조직층의 뚜렷한 증식이 관찰되었으며 수술 3주에서는 150ng을 주입한 배양조직세포군에서는 뚜렷한 골증식으로 양측 골단의 연골성 유합이 관찰되었고(Fig. 24 참조) 다른 군에서도 골막 주위로 골모세포의 증식과 신생골의 형성이 대조군에 비해 각각 분명하였다. 수술 3주이후로 결체조직층의 두께는 감소하는 양상을 보였으며 수술 4주에서 결체조직은 더욱 감소하였으나 성장인자를 투여하지 않은 군에 비해서는 좀 더 증식된 소견이었다. 통법의 수술과 성장인자 투여를 같이 시행한 군에서는 구개 양측에 노출된 골면 상부로 두꺼운 결체조직을 형성하고 술후 4주까지 유지되었으나 섬유주 주행방향은 성장인자를 투여하지 않은 통법의 수술군에 비해 뚜렷하지 않았다(Fig. 15, 25 참조) 신생골의 형성 역시 성장인자를 투여한 군은 수술방법과 상관없이 투여하지 않은 군보다 신생골의 형성이 보다 뚜렷하였다. 전체적으로 30ng보다는 150ng을 투여한 군에서 신생골 형성이 보다 빠른 경향을 보였다. 결론적으로 TGF-β3를 투여하였을 때 결체조직층과 골막주위로의 높은 밀도의 세포집락과 증식, 보다 오랜 기간동안의 결체조직의 활발

한 증식, 빠른 골재생의 소견을 보였다. 통법의 수술과 함께 성장인자를 투여한 군에서는 대조군에 비해 양측의 골노출부에서 반흔형성이 감소하는 경향을 보였다. 따라서 구개열부위에 일차수술시 후 창상 치유에 TGF-β3는 긍정적인 효과를 가져 올 수 있을 것으로 사료되었다.

V. 결 론

저자는 구개 결손부를 외과적으로 형성한 백서에서 자가 배양상피조직 이식이 상악골의 성장에 미치는 효과를 알아보고자 조직 이식후 치유과정과 상악골의 성장을 추적관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 통법의 수술군은 정상군에 비해 상악골의 성장이 작았으며 피부이식군과 배양상피조직 이식군은 통법의 수술군에 비해 상악골의 성장이 더 크게 나타났다.
2. 육안소견 및 광학현미경적 관찰에서 통법의 수술군에서의 반흔조직의 형성 및 성숙이 뚜렷하였고 출생 10주까지 지속된 반면, 배양상피조직 이식군은 배양상피를 이식한 결과 모두 생착하였으며 반흔조직의 형성은 통법의 수술군에 비해 미미하였다.
3. 수술시기를 달리하여도 출생 2주 및 4주에 수술한 군 모두에서 정상군, 피부이식군, 통법의 수술군의 순서로 상악골의 성장에 차이를 보였다.
4. TGF-β3주입군은 구개 결손부의 창상치유에서 대조군에 비해 결체조직과 골모세포의 증식과 신생골 형성이 뚜렷하였다. 이상의 결과에서 구개 결손부의 창상 치유과정에서의 반흔조직의 수축과 조직의 긴장은 상악골의 성장을 저해하는 것으로 보이며 배양조직의 구개 결손부 이식이 조직의 긴장을 줄이고 상악골의 성장에 기여할 수 있는 방법으로 사료된다. 또한 외부로부터의 TGF-β3의 투여는 구개 결손부의 수술 후 창상치유와 골재생에 효과적임을 보여 주었다. 임상적으로 보다 바람직한 구개열의 창상치유 및 골형성을 위해서는 향후 자가 배양상피-진피복합체의 배양 및 이식에 대한 개발과 TGF-β3를 포함한 여러 성장인자의 역할과 상호관계에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Ross RB : Treatment variables affecting facial growth in complete unilateral cleft lip and palate part 1: treatment affecting growth. Cleft palate journal 24:1 5-23, 1987.
2. Mars M, Houston WJB : A preliminary study of facial growth and morphology in unoperated male unilateral cleft lip and palate subjects over 13 years of age. Cleft palate journal 27:1 7-10, 1990.
3. Normando ADC, et al: Influence of surgery on maxillary growth in cleft lip and/or palate patients. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 20:111-118, 1992.
4. Smahel Z, et al : Facial growth and development in unilateral cleft lip and palate from the time of palatoplasty to the onset of puberty: A longitudinal study. J Craniofac Genet Dev Biol 15: 72-80, 1995.
5. Smahel Z, et al : Changes in craniofacial developmental due to modifications of the treatment of unilateral cleft lip and palate. Cleft

- Palate-Craniofacial Journal 35(3):240-247, 1998.
6. Wyszynski D.F. & Mitchell L.E. et al : Report of the newly formed international consortium for oral clefts genetics. Cleft Palate-Craniofacial Journal 36(2):174-178, 1999.
 7. Kremenak CR : Physiological aspects of wound healing : contraction and growth. Otolaryngol Clin North Am 17: 437-453, 1984.
 8. Bardach J., Mooney M. & Bardach E. : The influence of two-flap palatoplasty on facial growth in beagles. Plastic and Reconstructive Surgery 69(6):927-936, 1982.
 9. Bardach J, Kelly KM : Role of animal models in experimental studies of craniofacial growth following cleft lip and palate repair. Cleft palate journal 25:2 103-113, 1988.
 10. Wijdeveld MGMM, et al : A histologic study of tissue response to simulated palatal surgery at different ages on beagle dogs. Arch Oral Biol 36: 837-843, 1991.
 11. Leenstra TS, et al : Wound healing in beagle dogs after palatal repair without denudation of bone. Cleft palate-craniofacial journal 32:5 363-369, 1995.
 12. Jonsson G, Hallmans G : Healing of palatal defects with and without skin grafts. Int. J. Oral Surg. 9: 128-139, 1980.
 13. Ross RB : The clinical implications of facial growth in cleft lip and palate. Cleft palate journal 7:37-47, 1970.
 14. Ishikawa H, et al : Scar tissue distribution on palates and its relation to maxillary dental arch form. Cleft palate-craniofacial journal 35:4 313-319, 1998.
 15. Braekt MMHI, et al : Poly-(L-Lactic) Acid membranes in palatal surgery in beagle dogs: Clinical and histologic evaluation. Cleft palate-craniofacial journal 32:4 290-298, 1995.
 16. Fujioka M, Fujii T. : Maxillary growth following atelocollagen implantation on mucoperiosteal denudation of the palatal process in young rabbits : Implications for clinical cleft palate repair. Cleft palate-craniofacial journal 34:4 297-308, 1997.
 17. Losken A, et al: Comparative cephalometric study of nasal cavity growth patterns in seven animal models. Cleft palate-craniofacial journal 31:1 17-23, 1994.
 18. Losken A, et al : A comparative study of mandibular growth patterns in seven animal models. J Oral Maxillofac Surg. 50: 490-495, 1992.
 19. Siegel MI, Mooney MP : Appropriate animal models for craniofacial biology. Cleft palate journal 27:1 18-25, 1990.
 20. 유지, 이일우 : 생체조직공학: 개념과 응용. 1판 p 26 고려의학, 1998.
 21. Bonassar L. & Vacanti C.A. : Tissue engineering: The first decade and beyond. Journal of Cellular Biochemistry Supplements 30(31):297-303, 1998.
 22. Pollok J.M. & Vacanti J.P. : Tissue engineering. Seminars in Pediatric Surgery 5(3):191-196, 1996.
 23. Bell E, et al : Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. Science 211: 1052-1054, 1981.
 24. Zacchi V. et al : *In vitro* engineering of human skin-like tissue. Journal of Biomedical Materials Research 40(2):187-94, 1998.
 25. Bell E. et al : The reconstitution of living skin. The Journal of Investigative Dermatology 81:2s-10s, 1983.
 26. Jepsen A. : An *In vitro* model of an oral keratinizing squamous epithelium. Scand. J. Dent. Res. 82:144-146, 1974.
 27. Ross U.H. : *In vitro* production and subsequent transplantation of a living skin substitute in rat model. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 249:263-267, 1992.
 28. Anderson J.H., Furstman L. & Bernick S. : Postnatal development of the rat palate. J. Dent. Res. 46(2):366-372, 1967.
 29. Kaartinen V. et al : Transforming growth factor- β 3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. Developmental Dynamics 209:255-260, 1997.
 30. Melnick M. et al : Insulin-like growth factor II receptor, transforming growth factor- β , and Cdk4 expression and the developmental epigenetics of mouse palate morphogenesis and dysmorphogenesis. Developmental dynamics 211:11-25, 1998.
 31. Sun D. et al : TGF β 3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme *In vitro*. Development 125:95-105, 1998.
 32. Gold L.I. et al : Type I (R I) and Type II (R II) receptors for transforming growth factor- β isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor- β ligands during excisional wound repair. American Journal of Pathology 150(1):209-222, 1997.
 33. Greenhalgh D.G. : The role of growth factors in wound healing. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care 41(1):159-167, 1996.
 34. Roberts A.B. & Sporn M.B. : Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). [Mini-Review], Growth Factor 8:1-9, 1993.
 35. Bostrom MPG, Asnis P : Transforming growth factor beta in fracture repair. Clinical orthopaedics and related research 355S: 124-131, 1998.
 36. Rosier RN, O'Keefe RJ : The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. Clinical orthopaedics and related research 355S: 294-300, 1998.
 37. Coerper S. et al : Recombinant human transforming growth factor beta 3 accelerates gastric ulcer healing in rats. Scand. J. Gastroenterol. 32:985-990, 1997.
 38. Levine J.H. et al : Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor β 1, β 2 and β 3 during excisional wound repair. American Journal of Pathology 143(2):368-380, 1993.
 39. Mustoe T.A. et al : Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- β . Science 237:1333-1336, 1987.
 40. Mostoe T.A. et al : Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. J.Clin. Invest. 87:694-703, 1991.
 41. Pierce G.F. et al : Platelet-derived growth factor(BB Homodimer), transforming growth factor- β 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. American Journal of Pathology 140(6):1375-1388, 1992.
 42. Pierce G.F. & Mustoe T.A. : Pharmacologic enhancement of wound healing. Annu. Rev. Med. 46:467-481, 1995.
 43. Shah M. et al : Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor β . Lancet 339:213-214, 1992.
 44. Shah M., Foreman D.M. & Ferguson M.W.J. : Neutralisation of TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. Journal of Cell Science 108:985-1002, 1995.
 45. Wu L. et al : Transforming growth factor beta3(TGFbeta3) accelerates wound healing without alteration of scar prominence: Histologic and competitive reverse-transcription-polymerase chain reaction studies. Arch. Surg. 132:753-760, 1997.
 46. Murata M, et al : TGF- β 3 stimulates and regulates collagen synthesis through TGF- β 1-dependent and independent mechanisms. Journal of investigative dermatology 108:3 258-262, 1997
 47. O'kane S. & Ferguson M.W.J. : Transforming growth factor β s and wound healing. [Review], Int. J. Biochem. Cell Biol. 29(1):63-78, 1997.

사진부도 설명

- Fig. 8. Conventional surgery group, postop. 2 weeks: Scar tissue is shown on both lateral sides of palatal surface.
- Fig. 9. Conventional surgery group, postop. 8 weeks: Scar tissue is remained until sacrifice.
- Fig. 10. Cultured epidermal graft group, postop. 1week: Epithelization was completed on grafted area after 1week.
- Fig. 11. Negative control, postop. 1 week: Incomplete epithelization is shown on defect area after 1 week.
- Fig. 12. Cultured epidermal graft group, postop. 8 weeks: a strand of scar band is shown along the midline of palate.
- Fig. 13. Skin graft group, postop. 8 weeks: The elevated tissue along the midline has been regressed since postop. 4 weeks.
- Fig. 14. Conventional surgery group, postop. 2 weeks: The significant proliferation of connective tissue on the raw surface is shown. (Trichrome, $\times 100$)
- Fig. 15. Conventional surgery group, postop. 4 weeks: Dense collagen fibers were rearranged and fibers run horizontally from the Sharpey's fiber of tooth to mid-palate. (Trichrome, $\times 100$)
- Fig. 16. Cultured epidermal graft group, postop. 4 weeks: Collagen fibers are arranged coarsely and run vertically. (Trichrome, $\times 100$)
- Fig. 17. Conventional surgery group, postop. 8 weeks: Horizontally arranged dense collagen fiber is shown at sacrifice also. (Trichrome, $\times 100$)
- Fig. 18. Cultured epidermal graft group, postop. 5 days: Grafted epithelial cells proliferated to 3-4 layers on defect area. (H-E, $\times 40$)
- Fig. 19. Cultured epidermal graft group, postop. 1 week: Epidermis differentiated from basal layer to keratinized layer. (H-E, $\times 40$)
- Fig. 20. Negative control, postop. 1 week: The 2-3 layered epithelium is shown and defect area is depressed relatively. (H-E, $\times 40$)
- Fig. 21. Cultured epidermal graft group, postop. 2 weeks: Proliferating connective tissue is shown and defect area is elevated at postop. 2weeks. (H-E, $\times 40$)
- Fig. 22. Cultured epidermal graft group, postop. 4 weeks: Periosteal thickening around bony edge and new bone formation is shown. (H-E, $\times 40$)
- Fig. 23. The administration of TGF- β 3(30ng), postop. 1 week: High cellularity around connective tissue and periosteum on defect area is shown. (H-E, $\times 40$)
- Fig. 24. The administration of TGF- β 3(150ng), postop. 3 week: Rapid new bone formation after postop. 2 weeks was initiated and cartilaginous fusion was found on the central portion of defect at postop. 3weeks. (H-E, $\times 40$)
- Fig. 25. The administration of TGF- β 3(30ng), postop. 4 week: The connective tissue layer still thickened but the direction of collagen fiber was not significant compared to that of conventional surgery group. (Trichrome, $\times 100$)

사진부도 ①

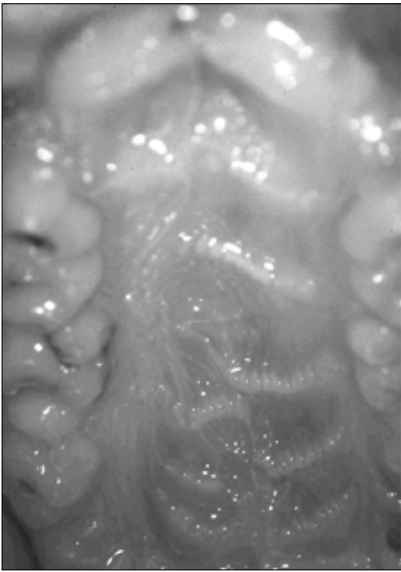


Fig. 8

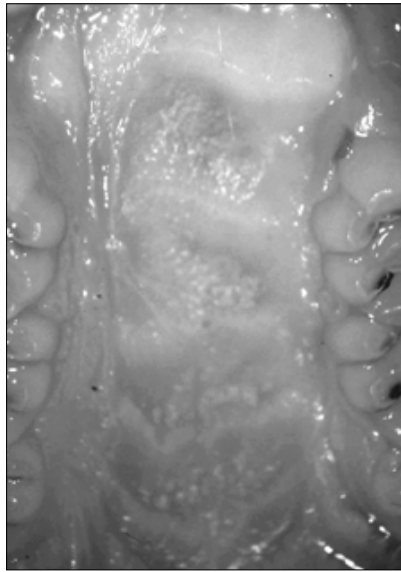


Fig. 9

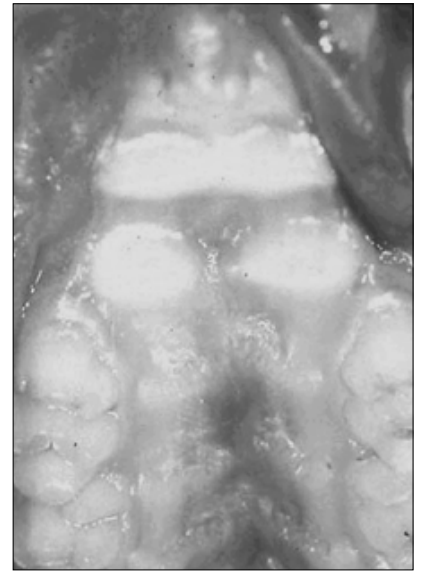


Fig. 10

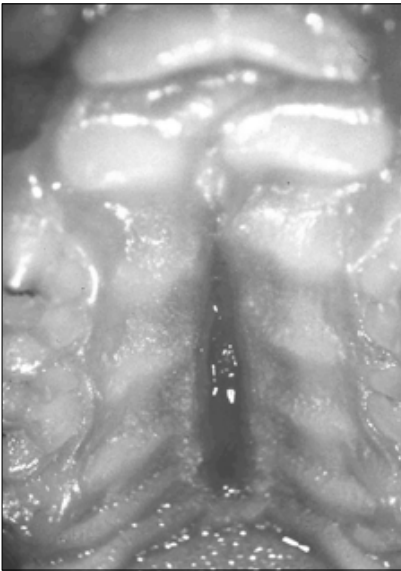


Fig. 11

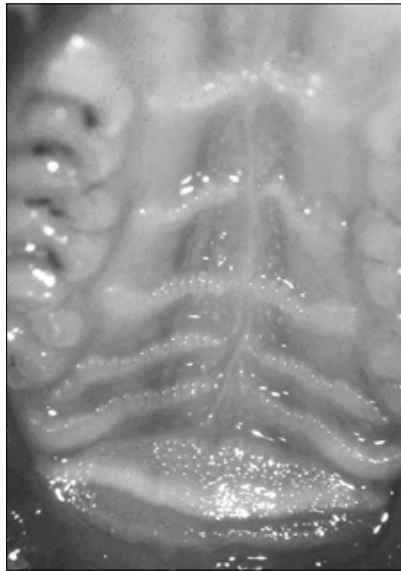


Fig. 12

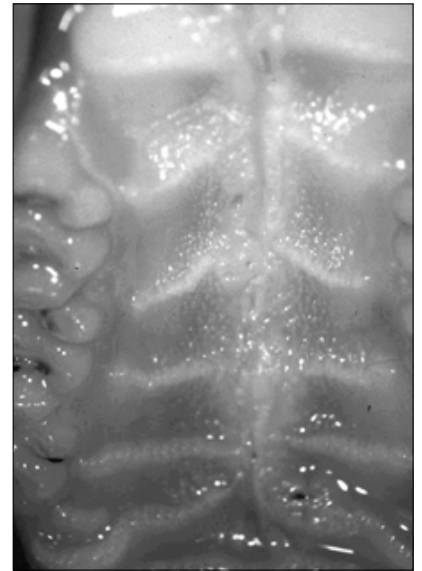


Fig. 13

사진부도 ②

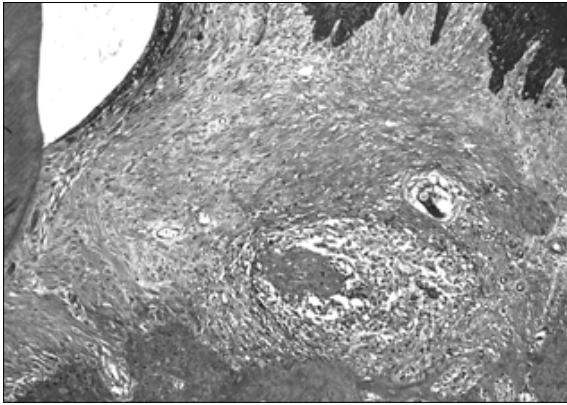


Fig. 14

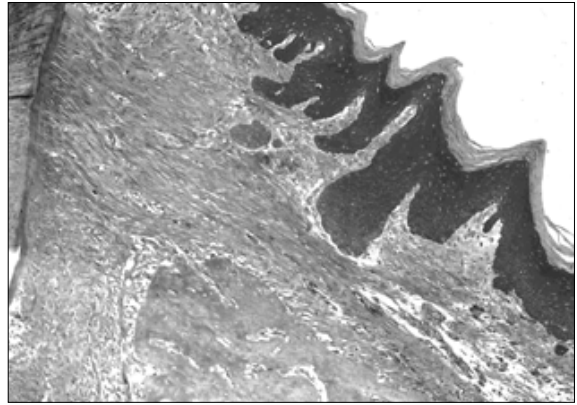


Fig. 15

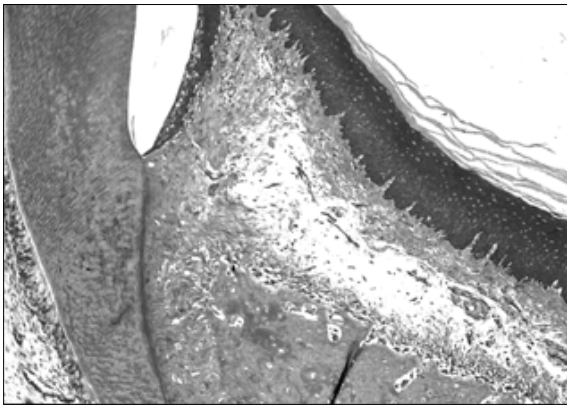


Fig. 16

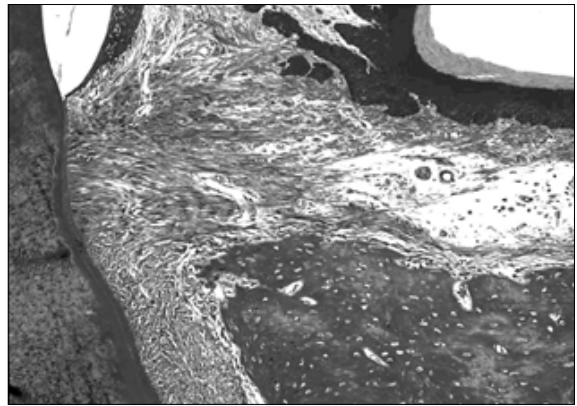


Fig. 17

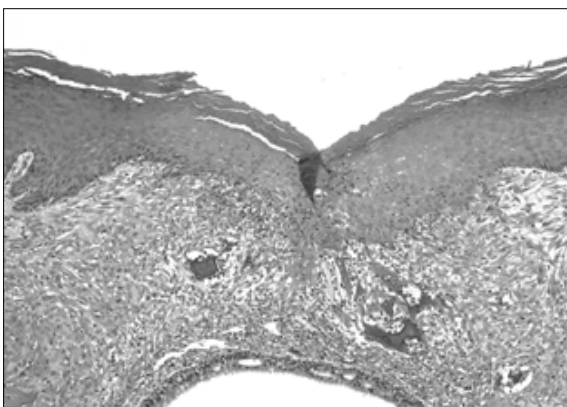


Fig. 18

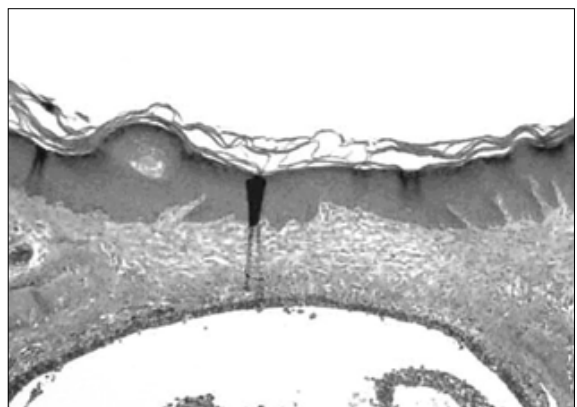


Fig. 19

사진부도 ③

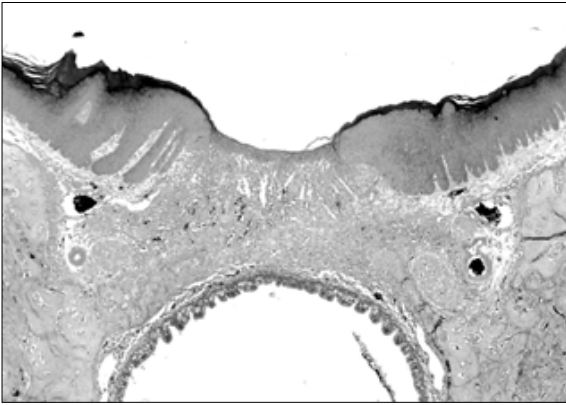


Fig. 20

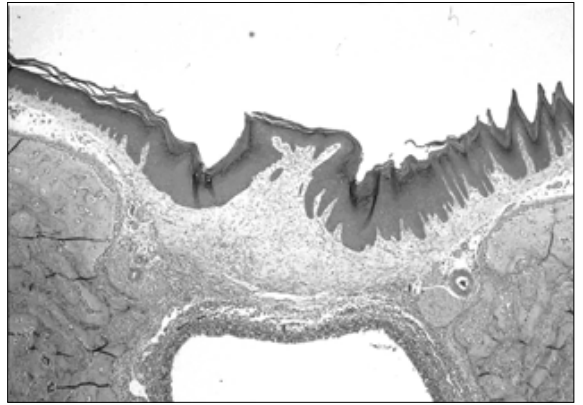


Fig. 21

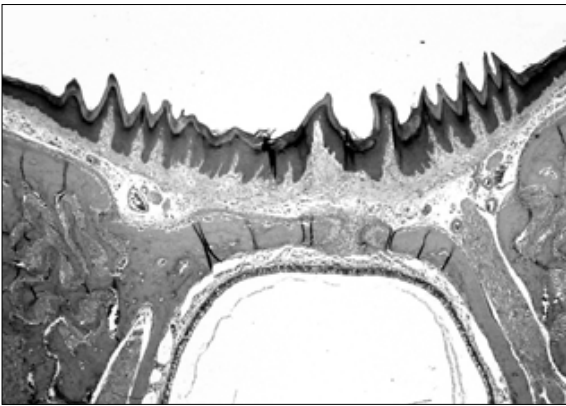


Fig. 22

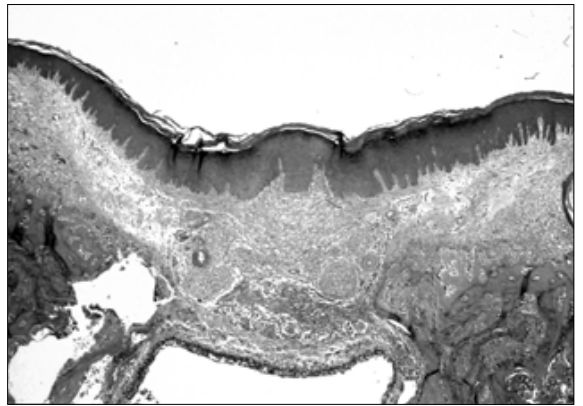


Fig. 23

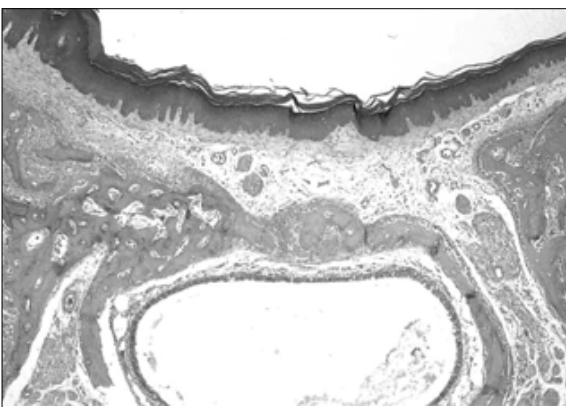


Fig. 24

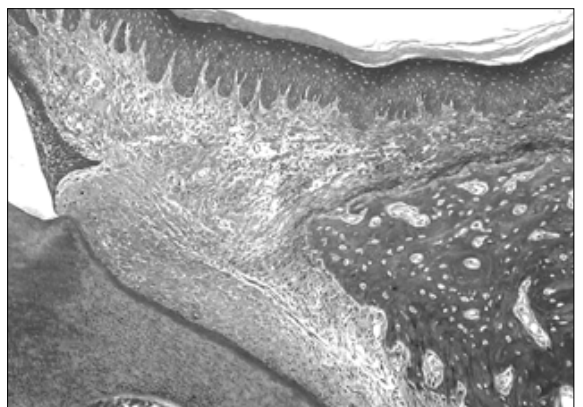


Fig. 25