

## 토끼 태자에 형성시킨 구순열상의 치유과정에서 수종 성장인자 분포에 관한 연구

백 승 학<sup>1)</sup> · 양 원 식<sup>2)</sup>

성체의 상처 치유과정 중 반흔조직 형성에 수종의 성장인자가 관련이 있는 것으로 보고되고 있으나, 태자의 피부상처가 반흔형성없이 치유되는 기전에 관한 성장인자의 역할은 아직 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구의 목적은 토끼 태자의 상처 치유과정에서 반흔조직의 형성과 관련이 있는 수종 성장인자의 분포를 조사하기 위한 것이다.

뉴질랜드산 흰 토끼를 임신 3기의 중반인 24일째에 자궁절개술을 시행하고 태자에 인위적으로 구순열상을 만든 후, 봉합한 군(봉합군)과 봉합하지 않은 군(비봉합군), 정상대조군(sham operated control group)으로 나누고 이들을 각각 수술 후 1, 2, 3, 5, 7일째에 회생시켜 상처치유에 대한 육안관찰 소견과 H & E 염색 소견 및 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, PDGF, bFGF의 면역조직화학적 염색 소견을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 봉합군과 비봉합군에서 전기간동안 염증반응과 반흔조직의 형성 그리고 신생 혈관의 형성 증가는 없었다.
2. 비봉합군의 재상피화가 봉합군에 비해 다소 느렸다.
3. bFGF는 정상대조군, 봉합군과 비봉합군에서 차이가 없었다.
4. PDGF는 봉합군과 비봉합군에서 1, 2일군에서 증가하였다가 그후 감소하여 정상대조군과 차이가 없었다.
5. TGF- $\beta$ 는 봉합군과 비봉합군에서 1, 2일군에서 약간 증가하였다가 그후 감소하여 정상대조군과 차이가 없었다.  
TGF- $\beta$ 1에 비하여 TGF- $\beta$ 2의 검출양이 많았다.

( 주요 단어: cleft lip, fetal wound healing, TGF- $\beta$ , PDGF, bFGF, immunohistochemistry)

### I. 서 론

순, 구개열은 선천성 두개안면 기형 중 발생빈도가 가장 높은 질환중의 하나이다. 순, 구개열 환자는 출생 후 파열부를 봉합하는 수술을 시행한 경우에 술후 반흔조직이 형성되어 상악골의 전방 및 측방의 열성장이 발생하게 되고 이에 따라서 악교정수술과 교정치료의 결과가 한계에 봉착하거나 불만족스럽게 되는 경우가 많다.

일반적으로 포유류 성체의 상처치유는 염증반응이

수반되며 반흔조직이 형성되어 조직이 수복되기 때문에 기능의 상실과 성장의 제한이 발생한다.<sup>13,23)</sup> 상처 치유는 외상에 대하여 조직의 연속성(tissue continuity)이 회복됨으로서 끝나는 반응이다. 어떤 양서류는 재생에 의해서 상처가 치유되기도 하지만, 포유류 성체의 상처치유과정은 지혈, 염증, 증식, 개조의 4단계로 구성되며 반흔조직의 형성으로 끝나게 된다<sup>30)</sup>. 첫째, 지혈단계에서는 혈관수축, 혈소판 응집과 과립분비(degranulation), 혈액응고, fibrin 형성이 일어난다. 둘째, 염증단계에서는 다형핵세포(poly-morphonucleotic leukocyte), 대식세포, 림프구의 순차적인 세포동원 (cellular cascade)이 발생하여 세균침투를 방어한다. 염증세포중 대식세포가 성체 상처 치유를 조절(coordinate)하는 결정적인 세포(effector

<sup>1)</sup> 치의학박사, 서울대학교 치과대학 치과교정학 교실, 기금전임 강사

<sup>2)</sup> 의학박사, 서울대학교 치과대학 치과교정학 교실, 교수

cell)이다. 순환중에 있는 단핵구(monocyte)가 화학주성물질에 의해 손상부위로 유인된 후 조직 파편을 털식하여 대식세포로 변하게 되거나, 국소에 있던 대식세포가 동원되기도 한다. 대식세포는 식작용외에도 단백분해효소, 보체(complement factor), 성장인자등의 여러 가지 물질을 분비<sup>35)</sup>하여 상처부위에 섬유아세포를 동원, 증식시키고 혈관생성(angiogenesis)과 상피세포이동을 자극하여 상처 치유에 기여하게 된다<sup>7,8,11,27)</sup>. 또한 손상에 의해 파괴된 조직파편, 이물질, 괴사된 조직등이 염증세포에 의해 깨끗이 제거되어야만 다음 단계로 이행될 수 있으므로 이 단계가 오래 지속되면 다음 과정이 지연되기 때문에 상처치유에 있어서 염증단계가 가장 중요하다. 셋째, 증식단계에서는 상처내로 분비된 다양한 화학주성물질과 성장인자에 의해서 섬유아세포, 혈관내피세포, 상피세포의 동원과 증식이 일어나<sup>42,47)</sup> 육아조직이 생성되며, 초기의 proteoglycan이 풍부한 fibrin 기질이 교원질로 대체된다. 넷째, 개조단계에서는 교원질이 교차연결(cross-link)되어 반흔조직이 성숙된다. keloid, hypertrophic scar, 협착(stricture), 복부내 유착(intraabdominal adhesion)등과 같은 비정상적인 상태의 상처 치유는 심미, 기능상의 문제점을 발생시킨다<sup>30)</sup>.

그러나 포유류 태자의 피부상처 치유는 성체의 상처치유과정에서 나타나는 염증반응이나 교원질의 불규칙적인 침착이 없으며, 치유속도가 빠르고,<sup>18,29,30,46,55)</sup> 정상적인 조직의 형태와 기능이 회복될 것으로 기대된다. 태아의 상처치유가 성체와 다른 이유로는 외부와 내부 기전으로 구분된다. 외부 기전으로는 hyaluronic acid, fibronectin, 성장인자등이 풍부한 양수를 들 수 있으며 이것이 태아의 피부 상처를 따뜻한 수성 환경으로 유지해준다. 내부기전으로는 면역체계를 들 수 있는데 태자의 외부환경은 절대적인 무균상태로서 임신 중반기까지 태아는 비교적 호중구감소증(neutropenia)을 유지하므로 면역체계가 성숙되지 못한 상태에 있다. 그리고 태아 상처조직에는 성숙한 다형핵세포는 거의 없고, 미성숙한 다형핵세포들이 존재하지만 이 세포들의 화학주성 능력(chemotactic ability)에도 문제가 있다. 또한 태아의 상처부위 조직의 구성과 세포들의 분화상태, 기능시 조직응력의 정도, 태아조직의 낮은 산소분압, 상처부위의 대사와 pH, 염증반응의 정도 등도 태아의 상처치유에 영향을 미친다<sup>30,55)</sup>.

Thomasson(1969)이 토끼 태자에 대한 실험방법<sup>52)</sup>을 제시한 이후로 많은 학자들이 다양한 동물을 상대

로 실험을 시행하였다. 그중에서 Hallock<sup>18)</sup>, Sullivan<sup>51)</sup>, Rowsell<sup>46)</sup>, Oberg<sup>36)</sup>은 쥐, Adzick<sup>1)</sup>, Somasundaram<sup>49)</sup>, Longaker<sup>29)</sup>, Krummel<sup>24)</sup>은 토끼, Longaker<sup>28)</sup>은 양, Candy<sup>5)</sup>는 염소, Hallock<sup>19)</sup>은 원숭이 태자에서 염증반응과 반흔 형성이 없는 상처 치유를 증명하였다. 특히 Whitby와 Ferguson<sup>56)</sup>은 쥐의 태자에서 상처 파열부 말단의 접근만으로도 재융합이 발생하여 정상적인 구순의 형태를 획득하였다고 하였다. 또한 다양한 실험방법들을 사용하여 성체와 태자의 상처치유에서 물리적<sup>26)</sup>, 화학적<sup>1,28)</sup>, 조직학적<sup>9,28,49)</sup> 차이를 밝히는 연구들이 진행되어 왔다.

최근 초음파 등을 이용한 진단방법의 발달로 인하여 태아의 선천성 기형을 임신초기에 발견할 수 있게 되어 태아를 한 사람의 환자로 간주할 수 있게 되었다<sup>45)</sup> 이를 계기로 수신증(bilateral hydronephrosis), 폐쇄성 수두증(obstructive hydrocephalus), 선천성 횡경막 탈장(congenital diaphragmatic hernia), 수막척수류(myelomeningocele), 대동맥판 협착증과 같은 심장흉부 질환, 천미골 기형종(sacrococcygeal teratoma)등과 같이 생명에 심각한 지장을 초래하는 선천성기형을 출산전에 자궁내수술을 시행함으로서 환아의 사망을 방지하거나, 그 예후를 호전시킬 수 있는 지의 여부에 대한 임상적 시도와 연구가 진행되어 왔다.

Christ와 Meininger는 사람에서 임신 28주에 양측성 구순구개열을, 임신 33주에는 편측성 구순구개열을 초음파진단으로 발견하였다고 보고하였다<sup>6)</sup>. 만약 태아의 구순열을 자궁내에서 수술하였을 경우 상기한 내용과 같이 현저한 염증반응이나 반흔형성없이 치유된다면 선천성 기형의 교정과 동시에 구순 팔약근(oral sphincter muscle)이 성장하는 태아에 정상적인 functional matrix로 작용하게 되고, 반흔조직에 의한 상악골의 이차적인 성장제한이 발생하지 않을 것이다.

상처 치유에 관련된 일련의 과정들은 손상부위 조직의 세포들(면역세포, 염증세포, 간엽세포)과 여러 가지 성장인자(TGF-β, PDGF, bFGF등)와 세포외기질 구성성분들(교원질, fibronectin 및 proteoglycan 등)간의 상호작용에 의하여 이루어지고 있다. 따라서 상처부위에 여러 종류의 세포들을 동원하고 세포외기질의 합성과 침착에 관여하는 여러 가지 성장인자들에 역할 규명이 필요하다고 생각된다.

성체의 상처 치유과정에서 반흔조직의 형성과 관련이 있는 성장인자들로는 PDGF, bFGF, TGF-β를

들 수 있다. PDGF는 섬유아세포의 강력한 유사분열 촉진물질이고 화학주성효과를 가지며, 단핵구와 호중 성구에 화학주성효과를 가지며, 교원질 합성을 조절 할 수 있다<sup>44)</sup>. bFGF는 강한 혈관생성효과를 가지며 섬유아세포의 증식과 세포외기질의 합성을 자극한다<sup>41)</sup>. TGF- $\beta$ 는 간엽조직세포의 증식을 촉진하고, 세포 외기질 특히 교원질과 fibronectin의 생성을 유도하고, 기질의 분해를 방해한다<sup>12,22,42)</sup>. 상기와 같이 성체의 상처치유과정중 반흔조직 형성에 수종의 성장인자가 관련이 있는 것으로 보고되고 있으나<sup>25)</sup>, 태자의 피부상처가 반흔형성없이 치유되는 기전에 대한 성장인자의 역할은 아직 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구의 목적은 태자의 피부상처 치유과정에서 반흔조직의 형성과 관련이 있는 수종의 성장인자의 분포를 조사하기 위한 것이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험 동물로 임신한 토끼 ( New Zealand White Rabbit )를 선택하였다. 토끼는 임신기간이 31-32일이며 자궁의 편측당 4마리씩, 총 8마리 가량의 태자를 임신하고 있었다.

### 2. 실험방법

#### 1) 수술방법

같은 환경에서 사육된 성숙한 암수를 합사하였고, 다음날 질도말에서 양성인 암컷을 수임 0일로 정하였다. 임신한 어미토끼는 최소 수술 2일전에는 동물실험실의 사육장에 도착하도록 하여 새로운 환경에 적응할 수 있도록 하였다. 임신 24일째에 총 20마리의 임신한 토끼 ( 평균 체중 4.2 Kg )를 다음과 같은 방법을 사용하여 수술하였다.

Ketamine HCl ( Ketalar, 유한양행 ) 1 ml 와 2 % xylazine hydrochloride ( Rompun, 한국 바이엘 ) 2 ml 를 대둔근에 주사하여 마취시켰고, 감염방지를 위하여 가나마이신 ( 3 ml )을 근육주사하였다. 토끼를 수술대에 고정한 후 수술부위를 제모하고 betadine ( povidone-iodine )으로 소독하였다. Lidocaine을 사용하여 국소마취를 한 후 토끼의 배꼽으로부터 최하부 유두까지 하복부 정중 개복 ( midline laparotomy )을 시행하여 쌍각자궁 ( bicornuate uterus ) 을 노출시



그림 1. 하복부 정중개복후 쌍각자궁의 노출

키고 각 자궁낭에 위치한 태자의 크기와 수를 확인하였다(그림 1).

수술을 시행할 태자는 Oberg<sup>36)</sup>의 방법을 참조하여 다음의 조건에 의하여 선정하였다.

첫째, 태자의 크기가 작을수록 수술위치로 조절하기가 어렵고, 더 많은 외상이 태자에 가해지기 때문에 자궁각(horn)의 말단에 있는 태자는 제외하였다. 둘째, 자궁경부에 인접한 부위의 자궁절개술은 조산을 초래하기 때문에 자궁경부 (cervix) 에 근접해 있는 태자도 제외하였다. 셋째, 한 각(horn)당 2마리 이상의 태자를 수술할 경우에는 자궁의 민감성과 조산확률을 증가시키기 때문에 한 각당 2마리 이상의 태자는 수술하지 않았다. 네째, 최소한의 조작으로 태자의 주둥이를 노출시킬 수 있는지 여부에 의하여 선택하였다.

자궁표면에서 태자를 촉진하여 태자의 머리부분을 확인한 후, 양수의 유출과 태자의 과도한 노출을 막기 위해서 자궁에 대하여 주머니끈 봉합(purse string suture, 5-0 silk)을 하였다. 각 태자의 주둥이와 접한 자궁면에 수술도(제11호)로 절개를 가한 후 미세수술용 조직가위로 양막과 용모막을 순차적으로 절개하였다. 이때 양수의 손실을 줄이기 위하여 태아를 자궁벽에 밀착시킨 상태로 자궁을 절개하였고 그 크기는 주둥이만을 노출시킬 정도로 최소한으로 하였다. 그 이유는 일단 태자의 두경부가 외부로 노출되면 다시 밀어넣기가 거의 불가능하며 이때 양수의 손실이 많아지기 때문이다(그림 2-A).

8배의 확대경 하에서 우측 비공저의 중앙부에서 직하방으로 인중 (clefted philtrum)에 평행하게 전충두



그림 2. 자궁절개술후 구순열상의 형성과 봉합장면

(A. 자궁절개술후 태자주둥이의 노출, B. 구순열상의 형성, C. 9-0 ethilon으로 봉합)

표 1. 일차항체

Primary Antibody raised against	Antibody type	Source	Dilution (in PBS)
PDGF-AA	polyclonal	R & D system	1:50
bFGF	polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:50
TGF- $\beta$ 1	polyclonal	R & D system	1:50
TGF- $\beta$ 2	polyclonal	R & D system	1:50

께(full thickness)로 iris scissor를 사용하여 절개를 가하였다. 그리고 입술부위에서 폭이 0.5 mm가 되게 쪼개기(wedge)형태로 2차 절개를 다시 가하여 조직을 제거함으로서 구순열과 유사한 상처를 만들었다(그림 2-B).

태자는 인위적으로 만든 구순열을 봉합하지 않은 군(비봉합군: 20마리), 봉합한 군(봉합군: 20마리), 정상대조군(sham operated control group: 20마리)으로 나누었다. 비봉합군은 봉합을 하지 않고 상처말단부(wound edge)를 근접만 시켰다(그림 2-A). 봉합군은 9-0 ethilon (Ethicon, 직경 100 마이크론) 봉합사를 사용하여 코와 입술의 경계를 정확히 접합시키도록 주의하여 단순 interrupted suture를 시행하였다(그림 2-C). 9-0 ethilon봉합사를 사용했던 이유로는 비흡수성 봉합사가 상대적인 불활성을 가지며, 흡수성 봉합사에 비해서 염증반응을 적게 유도하기 때문이다. 정상대조군은 태자에 구순열을 형성하거나 봉합수술을 하지 않고 노출만시켰다가 밀어넣었다.

태자의 주동이를 자궁안으로 밀어넣은 후 상실된 양수가 많을 경우에는 젠타마이신(0.1 mg/ml)을 포함한 따뜻한 Ringer's lactate를 채웠다. 주머니끈 봉합(5-0 silk)을 이용하여 자궁절개부를 봉합하였고 필

요한 경우에는 한 번 더 봉합(4-0 silk tie)을 하였다. 쌍각자궁은 무리한 힘을 주지 않도록 주의하면서 복부내로 원위치시켰다. 자궁의 과다한 수축으로 인한 유산을 방지하기 위하여 수술동안 따뜻한 식염수를 적신 가제로 자궁을 감싸 체온 유지에 유념하였다.

복막과 근육은 continuous suture (3-0 silk)로, 피하조직과 피부는 mattress suture (3-0 silk)로 봉합하였다. 수술부위의 복막과 피부는 젠타마이신액 (0.1 mg/ml saline)으로 세척하였다.

## 2) 육안소견 관찰과 조직표본 제작

어미가 출산직후 새끼를 먹는 것(cannibalism)을 막기 위해서 수술후 1, 2, 3, 5, 7일째에 pentobarbital을 과투여하여 어미를 회생시킨 후 제왕절개(Caesarean section)로 태자를 꺼내었다. 자발적인 호흡(spontaneous respiration)과 운동을 관찰하여 태자의 생존여부를 확인한 후, 생존한 태자를 정상대조군과 비봉합군, 봉합군으로 분류하여 무게를 재고 사진을 찍어서 각 군의 크기 및 안모 형태를 비교하였다.

그후 태자의 경부를 잘라서 회생시키고 두경부를 알루미늄 호일에 싸서 액체 질소 탱크에 순간적으로 냉동하고 Tissue-Tek OCT compound (Miles Inc.,

표 2. 각 군별 생존률

	1일	2일	3일	5일	7일	계
정상대조군	2/2 마리	2/3 마리	4/4 마리	3/3 마리	3/4 마리	14/16 마리
봉합군	2/3 마리	2/4 마리	3/3 마리	3/3 마리	3/3 마리	13/16 마리
비봉합군	1/2 마리	2/4 마리	3/3 마리	3/4 마리	2/3 마리	11/16 마리
계	5/7 마리	6/11 마리	10/10 마리	9/10마리	8/10마리	38/48 마리

Elkart, IN)에 포매하였다. 구순열상 부위를 섭씨 -20도에서 6 micrometer로 frozen section을 하고 Probe On TM plus microscope slide ( Fisher Biotech ) 상에 부착시켰다. 표본들중 일부는 H & E 염색, 나머지는 면역조직화학적 염색을 하기 위하여 섭씨 -70도의 냉동고에 보관하였다.

### 3) H & E 염색과 면역조직화학적 염색

H & E 염색은 통법에 의하여 시행하였고 면역조직화학적 염색을 위하여 아래와 같은 술식을 시행하였다.

조직의 내인성 과산화 효소 (endogenous peroxidase)는 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 10분동안 처리하여 비활성화시키고 증류수와 PBS로 세척하였다. 조직절편은 Zymed사의 Histostain-SP kit의 blocking agent로 10분간 처리하였고, TGF-β1, TGF-β2, bFGF, PDGF 각각에 대한 일차항체를 제조회사의 지시대로 회석하여 조직절편위에 떨어뜨린 후 섭씨 4도에서 다음날 아침까지 12시간동안 배양하였다(표 1). PBS로 세척한 후 TGF-β2, PDGF-AA는 DAKO사의 biotin이 부착된 이차항체로 10분간 배양하였고, TGF-β1, bFGF는 Histostain-SP kit (Zymed사)의 biotin이 부착된 이차항체로 10분간 배양하였다. PBS로 세척한 후 Histostain-SP kit의 streptavidine peroxidase로 10분간 배양하였으며 그후 PBS로 세척하고 aminoethyl carbazole (AEC)로 5분간 처리하여 발색시켰다. 증류수로 반응을 종료시키고 hematoxylin으로 대조염색하였다. 그후 증류수로 세척한 후 GVA 액 (Zymed사)을 사용하여 mount하고 현미경 (Olympus PM-10 AD)으로 검경하였다.

각 군의 상처 치유과정에 대하여 아래의 조직학적 소견을 검경하였다.

1. 염증반응 정도
2. 반흔조직형성정도
3. 신생혈관 형성 정도

4. TGF-β1, TGF-β2, bFGF, PDGF의 존재유무
5. TGF-β1, TGF-β2, bFGF, PDGF의 군별, 시간별 분포 차이 비교
6. 비봉합군의 상처 치유 양상

### III. 연구성적

#### 1. 수술성공률

본 실험에서 총 20마리의 임신한 어미토끼를 수술하였는데 2마리는 조산하였고, 마취제 과용으로 1마리는 수술중 사망하였으며, 전체 태자가 사망한 1마리가 있었다. 상기한 4마리를 제외한 16마리의 임신한 토끼에서 수술이 성공되었다(수술성공률 80%). 상기 16 마리의 임신한 어미토끼에서 태자수술이 시행되었던 48마리중 38마리의 태자가 제왕절개술시 생존하였다(생존률 79.2%). 봉합군에서는 16마리중 13마리가 생존하여 81.3%의 생존률을 보였고, 비봉합군에서는 16마리중 11마리가 생존하여 68.8%의 생존률을 보였다. 정상대조군은 16마리중 14마리가 생존하여 87.5%의 생존률을 보였다(표 2).

#### 2. 안면부의 육안소견

수술후 2일째 희생시킨 군에서 비봉합군은 구순열 부위에서 선상의 함몰 변형이 있었고, 구순열측의 상순은 위쪽으로 견인되어 있었고 구순열측의 비공이 편평해져 있어서 전체적으로 안면 비대칭을 보였다. 상처의 가장 자리는 재상피화가 진행되어 있었으나 상처의 중심부에는 완전한 재상피화가 되어 있지 않았다. 봉합군에서는 구순열을 수술한 부위에 재상피화가 진행되어 있었으며 안면비대칭은 비봉합군과 달리 별로 심하지 않았다.

수술후 7일째 희생시킨 군에서는 비봉합군은 여전히 구순열부위에 선상의 함몰 변형이 잔존해 있었으

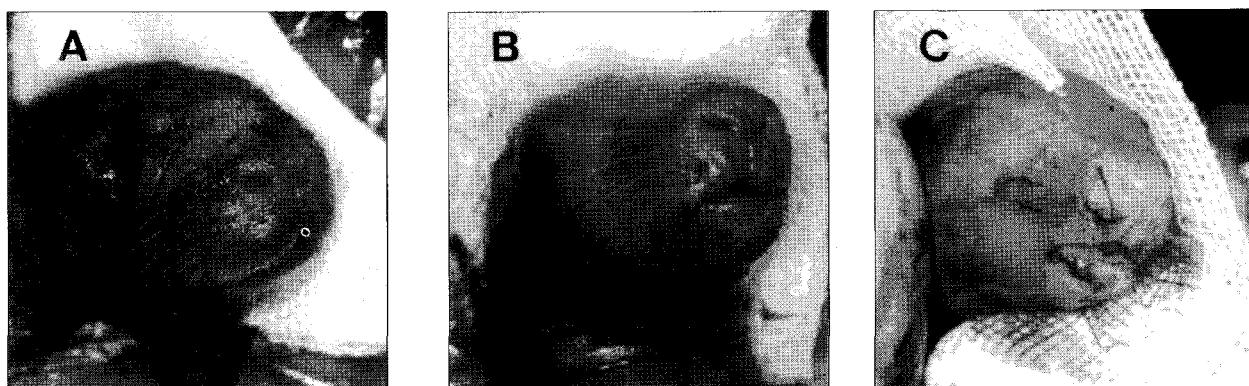


그림 3. 술후 7일째에 희생시킨 태자의 사진 (A. 정상대조군 B. 비봉합군 C. 봉합군 )

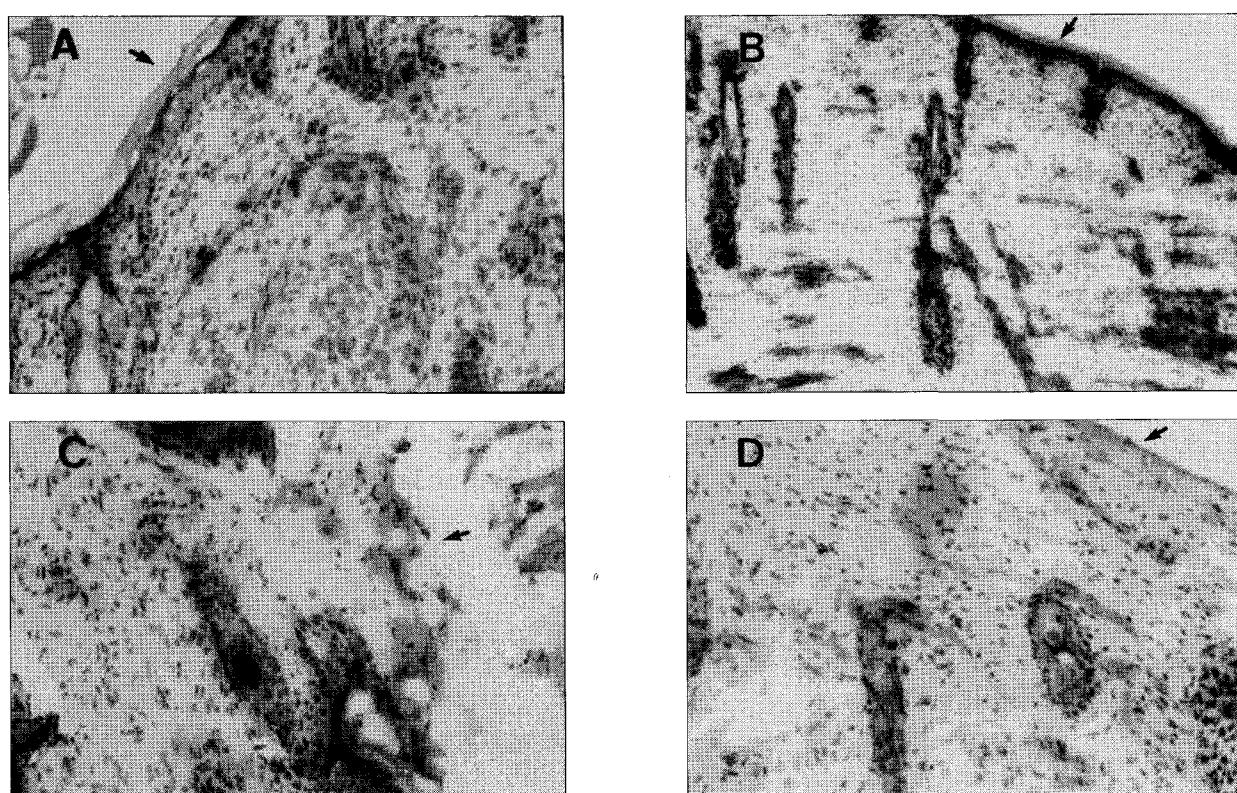


그림 4. H & E 염색소견 (절개부위는 화살표로 표시하였다.)

A 봉합 3일군(200배) B 봉합 7일군(200배) C 비봉합 3일군(200배) D 비봉합 7일군(200배)

나 재융합이 발생하여 재상피화가 되어 있었다. 그러나 코는 약간 편평하게 되어 있었고 안모는 비대칭적이었다. 봉합군에서는 수술부위에 완전한 융합이 발생하였고 재상피화가 잘 형성되었으며 코와 안면비대칭은 거의 없었고 입술의 형태도 정상적이었다(그림 3).

### 3. H & E 염색소견

봉합 2일군에서는 수술부위의 주위로 불완전한 재상피화를 보이는 점진적인 상처 치유가 진행되었고, 봉합 3일군에서는 수술부의 상피가 부드럽게 이행되었고 정상적인 피부형태를 보였다(그림 4-A). 봉합 7



그림 5. PDGF의 분포 (절개부위는 화살표로 표시하였다.) A) 봉합 1일군 (200배) B) 봉합 7일군 (200배)

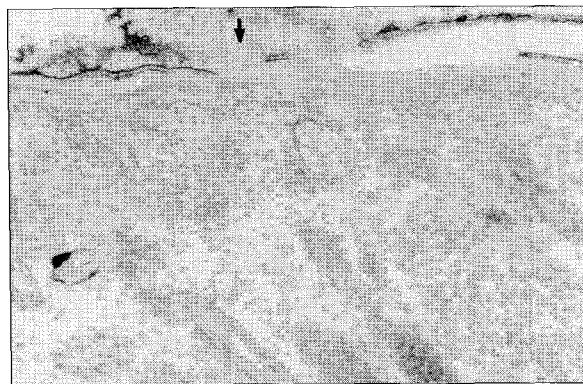
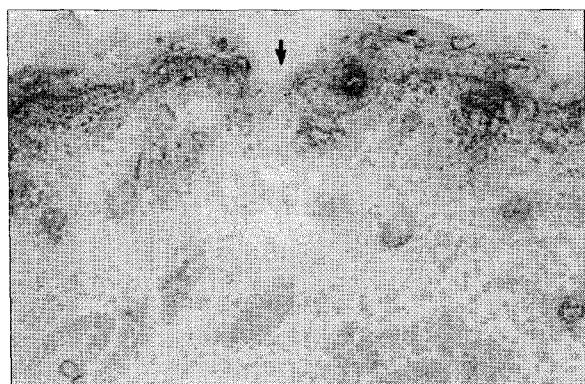


그림 6. bFGF의 분포 (절개부위는 화살표로 표시하였다.) A) 봉합 1일군 (200배) B) 봉합 5일군 (200배)

일군에서는 수술부위의 상피가 얇은 것을 제외하고는 표피부속기(예 hair follicle 형성)와 근육조직, 혈관등에서 재생이 일어났다(그림 4-B). 비봉합 2일군에서는 파열부와 그 내부에 clot이 존재하였으나, 비봉합 3일부터는 주위의 정상조직에 비해 세포들이 조밀하지는 않았지만 파열부 주위의 결체조직내에는 간엽조직세포들이 보였으며, 표피부속기와 재상피화의 불완전한 회복을 보이는 점진적인 상처 치유가 진행되었다(그림 4-C). 비봉합 7일군에서는 파열부의 상피가 약간 얇고 hair follicle 형성과 근육조직의 발달이 인접 정상조직에 비교하여 약간 작았으나 근섬유, 혈관등에서 장애가 되는 표식은 없었다(그림 4-D). 비봉합군은 재상피화가 봉합군에 비해서 다소 늦었으나, 파열부의 현저한 재융합이 일어났다. 그리고 봉합군과 비봉합군 모두에서 전기간동안 염증소견을 보이지 않았다.

#### 4. 성장인자들의 염색소견 (표 3)

##### (1) PDGF

봉합군과 비봉합군에서 동일한 양상이 발견되었다. 1, 2일군에서 PDGF는 상처의 주변경계부와 clot내에 존재하였다. 그후 재상피화가 일어나고 상처의 치유가 진행되면서 PDGF는 상처 중심부와 주변경계부에서 감소하여 5, 7일군에서는 인접 정상조직과 구별이 되지 않았다(그림 5).

##### (2) bFGF

봉합군과 비봉합군의 1, 2일군은 상처표면에서 증가된 염색 소견을 보였으나 상처의 중심부에는 특별히 증가된 소견을 보이지 않았다. 그리고 재상피화와 상처치유가 진행되면서 전기간동안 상처부위에서 정상대조군과 차이가 없었다(그림 6).

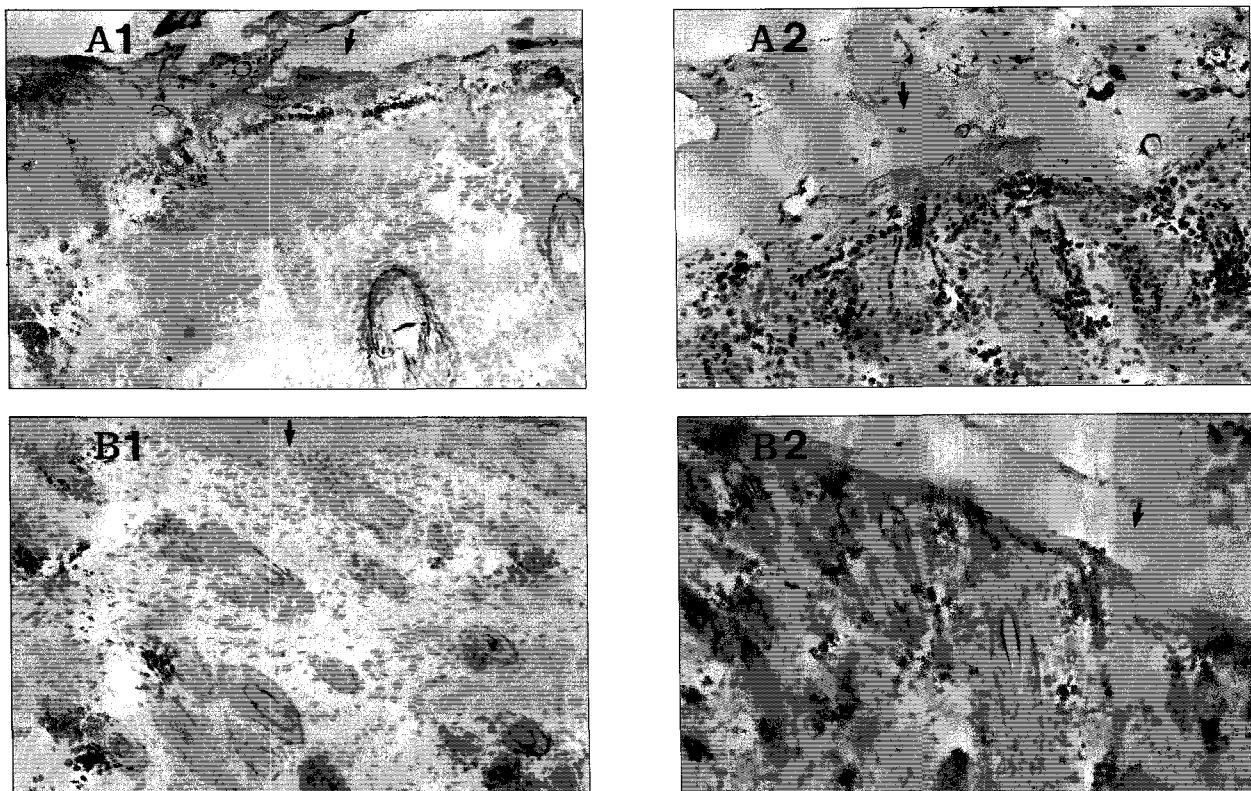


그림 7. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2의 분포 (절개부는 화살표로 표시하였다.)

- A) 봉합 2일군 A-1) TGF- $\beta$ 1 (200배) A-2) TGF- $\beta$ 2 (200배)  
 B) 봉합 7일군 B-1) TGF- $\beta$ 1 (200배) B-2) TGF- $\beta$ 2 (200배)

표 3. 성장인자들의 분포 (정상대조군에 대한 봉합군과 비봉합군의 비교)

회생시 킨 날짜	TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 2	PDGF	bFGF
1 일	약간 증가	약간 증가	증가	차이없음
2 일	약간 증가	약간 증가	증가	차이없음
3 일	차이없음	차이없음	약간증가	차이없음
5 일	차이없음	차이없음	차이없음	차이없음
7 일	차이없음	차이없음	차이없음	차이없음

### (3) TGF- $\beta$

TGF- $\beta$ 1과 TGF- $\beta$ 2는 정상 피하조직의 basal cell과 발육중인 hair follicle, 혈관주위에 나타났으며, 봉합군과 비봉합군의 1, 2일군에서 약간 증가를 보였으나 3일군 이후 감소하여 7일군에서는 상처 주위나 상처내에서 정상대조군과 차이가 없었다(그림 7). 전파

정동안 태아 피부의 모든 세포 특히 상피와 hair follicle에서 TGF- $\beta$ 1에 비하여 TGF- $\beta$ 2의 염색농도가 더 진하고 더 많이 나타났다.

### V. 총괄 및 고안

본 실험에서 실험 동물로 임신한 토끼(New Zealand White Rabbit)를 선택한 이유는 다수의 태자를 임신하며, 마취와 자궁절개술시에 어미와 태자의 사망률이 낮고, 출산후 수술정도에 비례해서 안면변형이 잘 나타나기 때문이었다. 수술은 임신 3기 중반인 24일째에 시행하였는데 그 이유는 이 시기에 태자의 구순부위가 수술하기에 적절한 크기와 적당한 경도를 가지고 있었고, 치유과정에서 반흔을 형성하지 않는 시기의 중반에 해당되기 때문이었다. 또한 태자의 사망률을 최소로 하기 위하여 어미 1마리당 2-4마리 평균 3마리의 태자에 대해서만 실험을 시행하였다. 수술에 대한 태자의 생존력은 표 3에 나타난 결과로

미루어 볼 때 수술 3일이후에 안정되는 것으로 생각된다. 그리고 봉합군, 비봉합군, 정상대조군간의 생존률 차이는 태자의 생존률이 봉합, 비봉합 및 상처유무에 연관된 것이 아니라 수술시 가해지는 외상, 어미와 태자의 생존력, 수술시 상실되는 양수의 정도, 태반 혈관의 폐색, 태반의 파열 등에 기인하는 것으로 생각된다.

육안소견(그림 3)과 H & E 염색소견(그림 4) 관찰에서 재상피화는 봉합군에서는 2-3일군에서 발생하였으나 비봉합군에서는 3일군 이후에 관찰되었다. 따라서 재상피화는 봉합군에 비해 비봉합군에서 다소 늦게 진행되었고, 상처부의 봉합이 상처 치유를 촉진시키는 것으로 생각된다. 그리고 재상피화의 완성 즉 상피세포의 이동이 정지된 후에야 기저막이 형성되는 것으로 생각되며 이것은 basal lamina의 구성요소(교원질 IV형, laminin, heparan sulphate)가 최근에 이동해온 상피의 하부에 형성되기 전에 재상피화가 발생하였다는 Whitby와 Ferguson<sup>55)</sup>의 연구결과와 같은 것이다. 5일군이후에 근육의 재생이 보였고, 이것은 태자의 근육상처에서 재생된 근육의 다발(bundle)이 상처부위에서 단절되거나 반흔조직과 겹쳐지지 않고 치유됨을 보인 Rowsell<sup>46)</sup>의 결과와 일치하였다. 따라서 구순괄약근이 정상적인 functional matrix로 작용할 수 있다고 생각된다. 7일군에서 비봉합군은 구순열부위의 선상 함몰과 안모의 비대칭이 봉합군에 비해서 뚜렷하였으나 상처부의 재융합이 발생하였다. 이는 쥐에서 상처말단부의 접근만으로도 재융합이 발생했다고 한 Rowsell<sup>46)</sup>, Whitby와 Ferguson<sup>55,56)</sup>의 연구결과와 유사한 것이다. 이것은 봉합군은 primary intention으로 치유되었고 비봉합군에서 상처의 수축이나 secondary intention에 의한 치유는 없었으며, 따라서 비봉합군에서의 재융합은 상처치유가 수복(repair)이 아닌 성장과 재생과정에 더 가깝다는 것을 의미한다. 그리고 봉합군과 비봉합군 모두에서 전기간 동안 염증반응은 없었으며, 이것은 Krummel<sup>24)</sup>과 Longaker<sup>29)</sup>와 동일한 실험결과를 보였다.

성체의 상처치유에서 성장인자의 중요성에 대한 연구<sup>25)</sup>와 태자조직의 발생학적인 관점에서 성장인자에 대한 연구<sup>21)</sup>에서 이들 양쪽 과정의 밀접한 관련은 성장인자가 상처치유와 성장에서 공통분모이며, 반흔 조직의 형성과 재생간의 다리역할을 하는 것으로 생각된다. 현재 태자의 상처에서 성장인자들의 분포에 대한 연구<sup>34,56)</sup>는 비교적 적다.

성체의 상처치유과정의 조절은 상처내로 분비된 화학주성물질과 성장인자에 의해서 촉진된다고 믿어진다<sup>17)</sup>. 그러나 태자의 상처치유과정에서 성장인자의 역할은 현재 잘 알려져 있지 않다.

PDGF는 혈소판의 alpha granule에 저장되어 있다가 혈액 응고기전의 발현 초기에 방출된다. 이것은 혈청내에 존재하는 가장 풍부하고 주된 유사분열물질(mitogen)로서 혈관내피세포와 섬유아세포에 대한 유사분열 촉진 및 화학주성효과 뿐만 아니라 단핵구와 호중성구등 염증세포에 대해서도 화학주성효과를 나타낸다는 보고가 있다.<sup>10,38,44,47)</sup> 또한 상기 작용으로 교원질의 생성량 자체를 증가<sup>17)</sup>시키기도 하지만 교원질의 전환 및 교차결합을 증가시켜서 창상내 긴장력(breaking strength)을 증가시키기도 한다는 보고<sup>38,39)</sup>가 있다.

그렇다면 섬유화와 반흔형성의 부족은 태자가 PDGF를 함유하고 있지 않거나 반응하지 않음을 암시한다. 그러나 PDGF에 대한 항체를 사용한 실험에서 쥐의 태자 상처에 PDGF가 존재한다는 것이 밝혀졌다<sup>56)</sup>. 그리고 Haynes의 연구<sup>20)</sup>에서 태자상처에 PDGF를 투여하여 성체와 같은 유형의 치유를 유도함으로서 태자가 PDGF에 반응한다는 것을 보였다. 그러나 이러한 연구들은 토끼의 태자에서는 시행되지 않았다.

본 연구에서 PDGF는 상처의 주변경계부와 clot 내에서 발견되었으며, 3일군 이후 감소하여 정상대조군과 차이를 보이지 않았고(그림 5), 이것은 쥐의 태자에 실험을 하였던 Whitby와 Ferguson<sup>56)</sup>와 같은 결과를 보였다. PDGF의 존재기간은 대식세포, 혈관내피세포에 의한 PDGF 유사인자 분비와 glycosaminoglycan에 대한 PDGF의 결합<sup>4)</sup>에 의하여 영향을 받는다. 따라서 PDGF 유사인자를 생성하는 염증세포의 결여가 PDGF의 짧은 존재기간을 설명할 수 있는 한 요소로 생각된다. 그리고 염증반응의 초기에 기여하는 혈소판의 응집능력이 신생아가 성체에 비해 현저히 낮다는 보고<sup>33)</sup>에 미루어 볼 때, 결과적으로 PDGF의 결여를 초래하게 되어 그후에 일어나는 일련의 염증반응이 약하게 되고 교원질 섬유의 형성을 주로 하는 반흔 형성이 억제될 것이라는 추론을 할 수 있게 한다.

bFGF는 다양한 조직내에 존재하며, 섬유아세포의 증식, 이동과 세포외기질 합성을 자극하고<sup>41)</sup> 강한 혈관생성 유도효과를 가진다<sup>15)</sup>. 본 연구에서는 봉합군과 비봉합군의 1, 2일군에서 상처표면에서 증가된 염

색소견을 보였으나 상처중심부에서는 특별히 증가된 소견을 보이지 않았다. 이것은 bFGF가 결체조직내에서 분비되었다기 보다는 양수에 포함되었던 bFGF가 불특정하게 도포된 것으로 생각된다. 그리고 전기간 동안 기저막과 상처부위의 결체조직에서 정상대조군과 차이를 보이지 않았다(그림 6). 이것은 쥐 태자의 기저막에 bFGF가 국소적으로 분포되어 있다는 Gonzalez 등의 연구<sup>16)</sup>와 동일한 결과이나, 쥐 태자의 상처치유과정에서 bFGF를 검출하지 못했다는 Whitby와 Ferguson<sup>56)</sup>과는 차이를 보였다. 그러나 태자 상처에서 bFGF의 낮은 level은 염증반응 결여에 따른 이차적인 것일 수도 있다. 왜냐하면 염증, 혈액응고에 의해서 활성화된 혈소판과 호중성구가 heparanase를 자극하여 세포외기질에 결합되어 있던 bFGF가 활성화된다는 주장<sup>41)</sup>이 있기 때문이다.

TGF- $\beta$ 의 subtype으로는 적어도 5가지가 알려져 있으나, 그중 가장 특징적인 것이 TGF- $\beta$ 1과 TGF- $\beta$ 2이다<sup>50)</sup>. TGF- $\beta$ 1과 TGF- $\beta$ 2는 현저한 상동성을 가지며, 유사한 수용기(receptor)에 결합한다<sup>14,50)</sup>. TGF- $\beta$ 는 혈액응고에 의해서 활성화된 혈소판의 alpha granule과 대식세포, 림프구에서 분비된다<sup>2,43)</sup>.

일반적으로 TGF- $\beta$ 는 세포의 증식과 혈관생성을 포함한 결합조직 대사의 조절 역할을 하고<sup>42)</sup> 섬유아세포의 화학주성을 자극한다<sup>40)</sup>. 또한 섬유아세포의 유도 이후 교원질, fibronectin, tenascin의 침착을 일으키고<sup>54,55)</sup>, 교원질 합성을 자극하여 교원질 축적을 유도하고<sup>22,42)</sup> 분해를 방해한다<sup>12)</sup>. 또한 단핵구, 대식세포에 화학주성효과를 가지므로 상처내로 세포들이 축적되게 하고 성장인자의 수준을 증가시키게 한다<sup>43)</sup>. TGF- $\beta$ 는 자가유도성질(autoinductive)<sup>53)</sup>을 가지므로 그 자신의 gene promotor에 결합하여 그 자신의 합성을 증가시킨다. 그리고 다른 성장인자의 합성을 자극하고<sup>43)</sup> PDGF와 상승작용을 일으킨다<sup>38)</sup>. TGF- $\beta$ 는 상피세포의 증식은 억제하나 분화는 촉진시키며, 교원질과 기저막형성에 관련된 다른 단백질의 형성을 증가시켜서 상처치유과정의 후기에서 상처의 개조와 응력을 증가시키는 작용을 하는 것으로 생각된다.

성체 상처 치유과정에서 TGF- $\beta$ 에 대한 항체를 투여하였을 경우 반흔조직의 형성이 억제되었고<sup>48)</sup>, 사구체신염의 동물실험에서 TGF- $\beta$ 1에 대한 항혈청주사에 의해서 세포외기질 합성의 병적인 증가가 억제되었으며<sup>6)</sup>, TGF- $\beta$ 의 국소 적용은 쥐에서 상처치유를 촉진시키고 상처의 breaking strength를 증가시켰

다<sup>32)</sup>. 그리고 TGF- $\beta$ 에 의해 결체조직 반응이 유도되기 때문에 TGF- $\beta$ 를 처리한 창상부위에는 혈관의 생성이 증진되었다<sup>42)</sup>. 상기와 같이 TGF- $\beta$ 를 성체의 상처 치유와 연관하여 연구한 논문<sup>38,42)</sup>은 많았으나, 태자 상처와 연관하여 연구한 것은 적었다.

본 연구에서는 TGF- $\beta$ 가 봉합군과 비봉합군의 1, 2 일군에서는 상처표면과 주변경계부에서 정상대조군보다 약간 증가하였으나 3일군이후 감소하여 정상대조군과 차이를 보이지 않았다(그림 7). 이것은 TGF- $\beta$ 가 검출되지 않았다는 Whitby의 동물실험<sup>56)</sup>과는 차이를 보였으나 TGF- $\beta$ 가 검출되었다는 Nath의 연구<sup>34)</sup>와는 일치하였다. 이러한 차이의 원인으로는 실험동물과 사용한 항체 및 분석방법의 차이, 일차항체에 검출되지 않는 inactive precursor의 생성등을 들 수 있다.

전과정동안 태아 피부의 모든 세포 특히 상피와 hair follicle에서 TGF- $\beta$ 1에 비하여 TGF- $\beta$ 2의 염색농도가 더 진하고 더 많이 나타났다. 이것은 정상적으로 분화하고 있는 태아의 피부구조물(피하조직, hair follicle)에서 TGF- $\beta$ 2가 TGF- $\beta$ 1 보다 많았다는 Nath의 연구<sup>34)</sup>와 일치하였다.

TGF- $\beta$ 가 토끼 태자에서 검출된 본 연구와 태자가 TGF- $\beta$ 를 생성하고 active form에 대한 수용기를 가진다는 Heine의 실험<sup>21)</sup>과 토끼 태자에 심은 polyvinyl alcohol sponge에 TGF- $\beta$ 를 첨가하면 섬유화가 발생한 실험결과<sup>25)</sup>에 미루어 볼때 태자에서 TGF- $\beta$ 가 존재하며 TGF- $\beta$ 에 대하여 세포들이 반응한다고 할 수 있다.

태자의 상처에서 TGF- $\beta$ 가 증가하지 않는 이유로는 과립분비 혈소판(degranulating platelets)의 수가 상대적으로 감소하였거나, 태자의 혈소판에서 TGF- $\beta$ 가 존재하지 않거나 불활성 상태로 분비되기 때문<sup>37)</sup>이라고 추측할 수 있다. 또한 염증반응의 결여도 태아 상처내로 단핵구, 대식세포 침윤의 결여나 감소에 의해서 TGF- $\beta$ 의 낮은 수준을 초래할 것으로 예상할 수 있다. 그러나 Nath의 성체 토끼의 실험<sup>34)</sup>에서 밝혀진 상처에서는 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2가 높은 level로 존재한다고 하였다. 따라서 성체와 태자에서 TGF- $\beta$ 의 차등적인 분포가 성체에서의 반흔생성과 태아에서의 무반흔형성에 중요하다는 것을 암시한다. 그러므로 태자 상처에서 TGF- $\beta$ 의 낮은 level이나 결여가 과도한 교원질 침착과 혈관생성을 막아 정상적인 조직외형의 회복으로 이어진다고 생각된다.

본 실험의 결과를 종합해보면 태아 상처 치유과정

에서 염증반응이 거의 없었고 성장인자와 화학주성 물질의 분비량이 작아서 상처내로 섬유아세포가 적게 동원, 증식되어 반흔성 창상 치유에 가장 근본적인 역할을 하는 교원질의 과도한 생성이 없을 것이라고 간접적인 추론을 할 수 있게 한다.

자궁내 태아의 구순열 교정수술은 첫째, 반흔이 없는 정상적인 구순의 형태를 재건할 수 있고, 둘째, 반흔 형성으로 인한 이차적인 상악골의 성장제한이 없어지게 되며, 셋째, 구순열에 동반된 이차적인 비부의 변형 방지가 가능해짐에 따라 보다 완벽한 수술결과를 얻을 수 있게 된다. 그러나 태아수술은 정확한 수술시기, 술중 태아의 호흡을 포함한 전신의 마취상태, 자궁수술의 위치 및 술기, 수술비용, 모체와 태아의 안전 및 술후의 재출산 여부 등의 법적, 도덕적, 경제적 요소들에 대한 검토가 따라야만 하며, 반드시 고등 척추동물에서의 실험이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

그러나 자궁내 태아수술은 명백한 장점들을 많이 지니므로 이를 인간에 적용하려는 노력은 계속되리라고 생각되며, 양수, 혈관생성, proto-oncogene expression, 성장인자, 대식세포의 조절, 세포외기질의 개조, hyaluronic acid와 교원질의 상호작용 등의 역할에 대한 연구가 태아 상처 치유의 기전 규명을 위해 더욱 필요할 것이라고 생각된다.

## V. 결 론

본 연구의 목적은 태자의 상처 치유과정에서 반흔 조직의 형성과 관련이 있는 수종 성장인자의 분포를 조사하기 위한 것이다. 뉴질랜드산 흰 토끼를 임신 3기의 중반인 24일째에 자궁절개술을 시행하고 태자에 인위적으로 구순열을 만든 후, 봉합군과 비봉합군, 정상대조군으로 나누고 이들을 각각 수술후 1, 2, 3, 5, 7일째에 회생시켜 상처치유에 관한 육안적 소견과 H & E 염색소견 및 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, PDGF, bFGF에 대한 면역조직화학적 염색 소견을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 봉합군과 비봉합군에서 전기간동안 염증반응과 교원질 침착의 증가와 반흔조직의 형성 그리고 신생 혈관의 형성 증가는 없었다.
2. 비봉합군의 재상피화가 봉합군에 비해 다소 느렸지만 상처말단부의 접근만으로도 재융합이 발생했다.

3. bFGF는 정상대조군, 봉합군과 비봉합군에서 차이가 없었다.
4. PDGF는 봉합군과 비봉합군에서 1, 2일군에서 증가하였다가 그후 감소하여 정상대조군과 차이가 없었다.
5. TGF- $\beta$ 는 봉합군과 비봉합군에서 1, 2일군에서 약간 증가하였다가 그후 감소하여 정상대조군과 차이가 없었다. TGF- $\beta$ 1에 비하여 TGF- $\beta$ 2의 검출양이 많았다.

## 참고문헌

- 1 Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, et al : Comparison of fetal, new born and adult wound healing by histologic, enzyme-histochemical and hydroxyproline determinations. *J Pediatr Surg* 20 : 315-319, 1985
- 2 Assoian RK, Fleurdeles BE, Stevenson HC, et al : Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 6020-6024, 1987
- 3 Border WA, Okuda S, Languino LR, et al : Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor  $\beta$ 1. *Nature* 346 : 371-374, 1990
- 4 Bowen-Pope DF, Malpass TW, Foster DM, et al : PDGF in vivo : Levels, activity and rate of clearance. *Blood* 64 : 458-469, 1984
- 5 Candy JW, Landas SK, Morris H, et al : In utero cleft palate repair in the ovine model. *Cleft Palate J* 31 : 37-44, 1994
- 6 Christ JE, Mininger MG : Ultrasound diagnosis of cleft lip and palate before birth. *Plast Reconstr Surg* 68 : 854-859, 1981
- 7 Clark RA : Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair. *Arch Dermatol* 124 : 201-206, 1988
- 8 Cromack DT, Reyes BP, Mustoe TA : Current concepts in wound healing : growth factors and macrophage interaction. *J Trauma* 30 : S129-S133, 1990
- 9 DePalma RL, Krummel TM, Durham LA, et al : Characterization and quantification of wound matrix in fetal rabbit. *Matrix* 9 : 224-231, 1989
- 10 Deuel TF, Senior RM, Huang JS, et al : Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 69 : 1046-1049, 1982
- 11 Diegelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM : The role of macrophages in wound repair : A review. *Plast Reconstr Surg* 68 : 107-113, 1981
- 12 Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, et al : Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6 :

- 1899-1904, 1987
- 13 Eischbach KJ, Bardach J : Effects of lip closure on facial growth in the surgically induced cleft rabbit. *Otolaryngol Head Neck Surg* 86 : 786-803, 1978
  - 14 Fanger BO, Wakefield LM, Sporn MB : Structure and properties of the cellular receptor for TGF  $\beta$ . *Biochemistry* 25 : 3083-3091, 1986
  - 15 Folkman J, Klagsbrun M : Angiogenic factors. *Science* 235 : 442-447, 1987
  - 16 Gonzalez A, Buscaglia M, Ong M, et al : Distribution of bFGF in the 18 day rat fetus : Localization in the basement membrane of diverse tissues. *J Cell Biol* 110 : 753-765, 1990
  - 17 Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, et al : Stimulation of granulation tissue formation by PDGF in normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 76 : 2323-2339, 1985
  - 18 Hallock GG : In utero cleft lip repair in A/J mice. *Plast Reconstr Surg* 75, 785-788, 1985
  - 19 Hallock GG, Rice DC, McClure HM : In utero cleft lip repair in the rhesus monkey : An update. *Plast Reconstr Surg* 80 : 855-858, 1987
  - 20 Haynes JH, Johnson DE, Mast BA, et al : Platelet-derived growth factor induces fetal wound fibrosis. *J Pediatr Surg* 29 : 1405-1408, 1994
  - 21 Heine UI, Munoz EF, Flanders KC, et al : Role of TGF  $\beta$  in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 105 : 2861-2876, 1987
  - 22 Ignotz RA, Massague J : TGF- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261 : 4337-4345, 1986
  - 23 Kremenak C, Huffman W, Olin W : Growth of maxillae in dogs after palatal surgery. *Cleft Palate J* 4 : 6-17, 1967
  - 24 Krummel TM, Nelson JM, Diegelmann RF, et al : Wound healing in the fetal and neonatal rabbit. *Surg Forum* 37 : 595-596, 1986
  - 25 Krummel TM, Michna BA, Thomas BL, et al : Transforming growth factor-beta induces fibrosis in a fetal wound model. *J Pediatr Surg* 23 : 647-652, 1988.
  - 26 Ksander GA, Ogawa Y, Chu GH, et al : Exogenous transforming growth factor beta 2 enhances connective tissue formation and wound strength in guinea pig dermal wound healing by secondary intention. *Ann Surg* 211 : 288-294, 1990
  - 27 Leibovich SJ, Ross R : The role of the macrophage in wound repair : A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78 : 71-92, 1975
  - 28 Longaker MT, Whitby DJ, Adzick NS, et al : Studies in fetal wound healing, VI. Second and third trimester fetal wounds demonstrate rapid collagen deposition without scar formation. *J Pediatr Surg* 25 : 63-69, 1990.
  - 29 Longaker MT, Dodson TB, Kaban LB : A rabbit model for cleft lip repair. *J Oral Maxillofac Surg* 48 : 714-719, 1990
  - 30 Longaker MT, Adzick NS : The biology of fetal wound healing : A review. *Plast Reconstr Surg* 87 : 788-798, 1991.
  - 31 Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, et al : Role of PDGF in wound healing : synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 7696-7700, 1987
  - 32 Mustoe TA, Pierce GF, Thomason AT, et al : Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science* 237 : 1333-1336, 1987
  - 33 Mull MM, Hathaway WE : Altered platelet function in newborns. *Pediatr Res* 4 : 229-237, 1970
  - 34 Nath RK, LaRegina M, Markham H, et al : The expression of TGF  $\beta$  in fetal and adult rabbit skin wounds. *J Pediatr Surgery* 29 : 416-421, 1994
  - 35 Nathan CF : Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79 : 319-326, 1987
  - 36 Oberg KC, Evans ML, Nguyen T, et al : Intrauterine repair of surgically created defects in mice (Lip incision model) with a microclip : preamble to endoscopic intrauterine surgery. *Cleft Palate J* 32 : 129-137, 1995
  - 37 Olutoye OO, Yager DR, Cohen IK, et al : Lower cytokine release by fetal porcine platelets : a possible explanation for reduced inflammation after fetal wounding. *J Pedia Sur* 31 : 91-95, 1996
  - 38 Pierce GF, Brown D, Mustoe TA : Quantitative analysis of inflammatory cell influx, procollagen type I synthesis, and collagen cross-linking in incisional wounds : Influence of PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 therapy. *J Lab Clin Med* 5 : 373-382, 1991
  - 39 Pierce GF, Mustoe TA, Attrock BW, et al : Role of PDGF in wound healing. *J Cell Biochem* 45 : 319-326, 1991
  - 40 Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, et al : Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblast by TGF  $\beta$ . *J Exp Med* 165 : 251-256, 1987
  - 41 Rifkin DB, Moscatelli D : Recent developments in the cell biology of bFGF. *J Cell Biol* 109 : 1-6, 1989
  - 42 Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al : Transforming growth factor type beta : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 4167-4171, 1986
  - 43 Roberts AB, Sporn MB : Transforming growth factor  $\beta$ . *Adv Cancer Res* 51 : 107-145, 1988
  - 44 Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF : The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46 : 155-169, 1986
  - 45 Rowlett U : Intra-uterine wound healing in a 20-week human fetus. *Virchows Arch* 381 : 353-361, 1979
  - 46 Rowsell AR : The intrauterine healing of fetal muscle wounds : experimental study in the rat. *Br J Plast Surg*

- 37 : 635-642, 1984
- 47 Seppa HE, Grotendorst G, Seppa S, et al : The platelet derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts. *J Cell Biol* 92 : 584-588, 1982
- 48 Shah M, Foreman DM, Ferguson MW : Control of scarring in adult wound by neutralizing antibody to transforming growth factor-beta. *Lancet* 339 : 213-214, 1992
- 49 Somasundaram K, Prathap K : Intra-uterine healing of skin wounds in rabbit foetuses. *J Pathol* 100 : 81-86, 1970
- 50 Sporn MB, Roberts AB : Transforming growth factor beta : Recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 119 : 1017-1021, 1992
- 51 Sullivan WG : In utero cleft lip repair in the mouse without an incision. *Plast Reconstr Surg* 84 : 723-732, 1989
- 52 Thomasson BH, Ravitch MM : Fetal surgery in the rabbit. *Surgery* 66 : 1092-1102, 1969
- 53 Van Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders KC, et al : TGF- $\beta$ 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem* 263 : 7741-7746, 1988
- 54 Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA : Transforming growth factor  $\beta$  causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247 : 597-604, 1987
- 55 Whitby DJ, Ferguson MWJ : The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development* 112 : 651-668, 1991
- 56 Whitby DJ, Ferguson MWJ : Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* 147 : 207-215, 1991

-ABSTRACT-

**A STUDY ON THE DISTRIBUTION OF  
SEVERAL GROWTH FACTORS IN THE ARTIFICIALLY CREATED  
CLEFT LIP WOUND HEALING OF RABBIT FETUSES**

Seung-Hak Baek, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Won-Sik Yang, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

*Department of Orthodontics, College of Dentistry, Seoul National University*

Recently several growth factors such as TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, PDGF, bFGF are known to play an important role in scar formation following adult tissue injury. But there is little known about the role of growth factors in fetal tissue healing without scar formation. Therefore the purpose of this study is to investigate the distribution of growth factors which are involved with scar formation in the artificially created cleft lip wound healing of fetuses.

The author had undergone hysterotomy and created cleft lip-like defects on fetuses of New Zealand White Rabbit in mid-third trimester (24 days). Fetuses were divided into 3 groups (the repaired group, the unrepairs group and the sham-operated control group). At 1, 2, 3, 5, 7 days after procedure, the repaired, the unrepairs and the control groups were obtained by Caesarean section. After documenting the viability of fetuses, fetuses were photographed to compare size and facial morphology and sectioned for histological examination by H & E stain and spatial and temporal deposition of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, PDGF, bFGF by immunohistochemical method.

The findings are summarized as follows

1. There were lack of inflammation and scar formation and neovascularity in the repaired and the unrepairs group during experimental periods.
2. The reepithelialization of the unrepairs group was slower than that of repaired group.
3. There were no differences of distribution of bFGF in the control, the repaired and the unrepairs group.

4. PDGF was increased at post-op. first and second day and decreased after post-op. third day. Eventually, there were no differences in the control, the repaired and the unrepairs group.
5. TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 were slightly increased at post-op. first and second day and decreased after post-op. third day. Eventually there were no differences in the control, the repaired and the unrepairs group. And TGF- $\beta$ 2 is more densely stained than TGF- $\beta$ 1.

KOREA. J. ORTHOD. 1997 ; 27 : 683-696

\* Key words : cleft lip, fetal wound healing, TGF- $\beta$ , PDGF, bFGF, immunohistochemistry