

토끼 태자에 형성시킨 구순열상의 치유과정에서 세포외기질 분포에 관한 연구

양 원 식¹⁾ · 백 승 학²⁾

태아와 성체의 상처치유과정에서 다른 점으로는 태아 상처가 염증반응과 반흔조직의 생성이 없이 신속히 치유됨을 들 수 있다. 태자상처의 비반흔성 치유와 세포외기질의 역할을 연관지어 해석하려는 노력이 진행중에 있으나, 각 실험 동물종간의 차이 및 세포외기질 구성요소의 다양성 등 많은 변수가 아직 미결의 과제로 남아 있다. 본 연구의 목적은 토끼 태자의 상처 치유과정에서 반흔조직의 형성과 관련이 있는 세포외기질의 주요성분인 교원질 I, III, IV, V형, fibronectin, laminin의 시기적 출현 및 분포양상을 조사하기 위한 것이다.

뉴질랜드산 흰 토끼를 임신 3기의 중반인 24일째에 자궁절개술을 시행하고 태자에 인위적으로 구순열상을 만든 후, 봉합군(봉합군)과 봉합하지 않은 군(비봉합군), 정상대조군(sham operation group)으로 나누고 이들을 각각 수술후 1, 2, 3, 5, 7일째에 희생시켜 상처치유에 대한 육안관찰 소견과 H & E 염색 소견 및 교원질 I, III, IV, V형, fibronectin, laminin의 면역조직화학적 염색 소견을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 봉합군과 비봉합군에서 전기간동안 염증반응은 없었다.
2. 비봉합군의 재상피화가 봉합군에 비해 다소 느렸다.
3. 교원질 I, III, V형은 봉합군과 비봉합군에서 2일군까지는 발견되지 않았고 3일군이후 존재하였으나 염색정도가 인접정상조직이나 정상대조군에 비하여 증가하지 않았다.
4. 상피 기저막에서 교원질 IV형의 염색소견은 봉합군과 비봉합군에서 3일군이 다소 증가하였으나 그후 감소하여 인접정상조직이나 정상대조군과 차이가 없었고, laminin의 염색 소견은 봉합군과 비봉합군에서 5일군이후 발견되었고 염색정도의 증감없이 7일군까지 유지되었고 인접정상조직이나 정상대조군과 차이가 없었다.
5. 혈관내세포 기저막에서 laminin과 교원질 IV형의 염색소견은 인접정상조직이나 정상대조군에 비해서 증가하지 않았다.
6. Fibronectin은 봉합군과 비봉합군에서 fibrin clot과 창상 기저부 및 창상연을 따라 3일군까지 염색소견이 증가하였다가 그후 감소하여 인접정상조직이나 정상대조군과 차이가 없었다.

(주요단어 : 구순열, 태자상처치유, 교원질, fibronectin, laminin, 면역조직화학법)

I. 서 론

상처치유는 세포외기질의 합성과 개조를 동반한

세포의 이동, 증식, 분화등이 이루어지는 복잡한 과정이다. 일반적으로 포유류 성체의 상처치유는 염증반응이 수반되고 반흔조직이 형성되어 조직이 수복되기 때문에 기능의 상실과 성장의 제한이 발생한다. 그러나 포유류 태자의 피부상처 치유는 성체의 상처치유과정에서 나타나는 염증반응이나 교원질의 불규칙적인 침착이 없으며, 치유속도가 빠르다^{5,19,31,38,49}. 순, 구개열은 선천성 두개안면 기형증 발생빈도가

¹⁾ 서울대학교 치과대학 치과교정학교실, 교수.

²⁾ 서울대학교 치과대학 치과교정학교실, 기금전임강사.

*이 논문은 1996년도 서울대학교병원 일반연구비(04-96-045)지원으로 이루어진 것임

가장 높은 질환중의 하나이다. 순, 구개열 환자는 출생 후 파열부를 봉합하는 수술을 시행한 경우 술후 반흔 조직이 형성되어 상악골의 전방 및 측방의 열성장이 발생하게 되고 이에 따라서 악교정수술과 교정치료의 결과가 한계에 봉착하거나 불만족스럽게 되는 경우가 많다.

최근 초음파 등을 이용한 진단방법의 발달로 인하여 태아의 선천성 기형을 임신초기에 발견할 수 있게 되어 태아를 한 사람의 환자로 간주할 수 있게 되었다. 만약 태아의 구순열을 자궁내수술로 치료하였을 경우 혈저한 염증반응이나 반흔형성없이 치유된다면 선천성 기형의 교정과 동시에 구순괄약근이 성장하는 태아에 정상적인 functional matrix로 작용하게 되고, 반흔조직에 의한 이차적인 상악골의 성장제한이 발생하지 않을 것이다^{16,22)}.

Thomasson이 토끼 태자에 대한 실험방법⁴⁵⁾을 제시한 이후로 많은 학자들이 다양한 동물을 상대로 실험^{2,5,19,20,23,30,31,37,38,41,44)}을 시행하여 염증반응과 반흔 형성이 없는 상처 치유를 증명하였다. 또한 다양한 실험 방법들을 사용하여 성체와 태자의 상처치유기전에서 물리적, 화학적, 조직학적 차이를 밝히는 연구들^{2,5,14,15,18,28,30,41,46)}이 진행되어 왔다.

세포외기질의 구성성분중 반흔조직의 형성과 관련이 있는 것으로는 hyaluronic acid, fibronectin, laminin, 교원질등을 들 수 있다.

Hyaluronic acid는 상처 치유과정중 혈소판 침전물에서 가장 먼저 나타나는 거대분자로서 세포외 기질의 구조화에 결정적인 역할을 한다^{14,23)}. 태아 조직이나 중식 및 재생이 활발히 일어나는 조직에 고농도로 존재하며⁴⁷⁾, 세포분화를 억제하고 세포의 이동, 중식 및 재생에 관여하는 것으로 생각된다²⁶⁾.

Fibronectin은 disulfide-linked dimeric glycoprotein으로서 창상치유시 혈장과 혈소판의 알파과립으로부터 유래되거나, 섬유아세포 및 상피세포로부터 국소적으로 합성된다. 또한 양수에도 다량 함유되어 있으며, 배아발생단계(embryonic development)의 초기 세포외기질의 주요 구성성분이며, 상처 치유시 세포외기질 재생을 위한 임시기질(provisional matrix)로서 작용하며²⁵⁾, 단핵구, 섬유아세포 및 내피세포에 대한 주화작용, 중성구와 fibronectin간의 부착을 통하여 보체성 탐식작용, 각종 세균등과 결합하여 미생물의 opsonin작용, 배아성 맥관형성(embryonic angiogenesis) 및 내피세포의 재생에도 관여한다. 그리고 세포간 부착과 이동을 위한 저질(substratum)으

로 작용하는 것으로 알려져 왔다^{11,12,21,42,49)}.

Laminin은 혈관과 상피의 기저막에 존재하는 비교 원질성 glycoprotein으로서 세포의 부착과 분화 그리고 neurite outgrowth에 관여한다고 알려져 있다.

교원질은 세포외기질의 주요소이며, 반흔조직은 불규칙적인 교원질 다발의 침착이라고 정의할 수 있다. 대표적인 종류로는 I, III, IV, V, VI, VII형 등이 있다. 그중에서 교원질 I형은 피부, 골, 인대등 대부분의 결합조직에 존재하며 인장력(tensile strength)을 제공하는 주요 구성성분이다. 교원질 III형은 피부, 혈관, 특히 태아조직에 많이 분포하며 인장특성(tensile properties)에 기여한다. 교원질 IV형은 기저막과 anchoring plaques에 존재하며 기저막의 주요 구성성분이다. 교원질 V 형은 대부분의 조직에 존재하며 세포표면과 주위 기질을 접속시킨다. 교원질 VI 형은 세포의 미세섬유(extracellular microfibril)에 존재하고 matrix assembly의 역할을 한다. 교원질 VII 형은 피부와 fetal membrane에 존재하며 anchoring fibril의 구조성분(structural component)이다.

태자의 상처치유에서 반흔이 형성되지 않는 원인을 규명하기 위한 최근의 연구동향은 성장인자와 세포외기질에 관한 2가지로 나눌 수 있다. 성장인자에 관한 연구는 저자들의 기존 연구²⁾에서 반흔조직형성과 관련이 깊은 성장인자들의 태자 상처내의 분비가 증가하지 않은 것이 무반흔 형성 치유와 관계가 있는 것으로 생각된다. 그리고 세포외기질에 관한 연구는 많은 학자들이 다양한 종, 임신시기, 상처 모델을 사용하여 연구를 진행하였다^{15,27-34,39)}.

교원질 합성에 관하여 Adzick⁵⁾은 태자의 상처에서 hydroxyproline의 축적을 확인하여 교원질 침착을 보고하였고, Longaker^{28,30)}는 fibronectin과 교원질, Burd⁹⁾는 교원질 축적을 보고하였다. 안등³⁾, 정등⁴⁾, DePalma^{14,15)}, Krummel²⁴⁾, Longaker³⁴⁾, Stern⁴³⁾의 연구에서 태아의 세포외기질은 성체의 상처에서 나타나는 교원질이 많은 반흔조직보다는 hyaluronic acid가 풍부한 proteoglycan으로 주로 구성되었다고 하였다. 그리고 Longaker³³⁾는 양수의 hyaluronic acid 자극 효과에 대해서 연구하였다. 노등¹⁾, Clark^{11,12)}, DePalma¹⁴⁾, Krummel²⁴⁾, Longaker²⁸⁾등은 fibronectin에 관한 연구를 진행하였다. Whitby와 Ferguson⁴⁹⁾는 태아의 세포외기질 중 특히 fibronectin, laminin, tenascin 등이 세포의 부착, 유착, 이동을 위한 바람직한 미세환경(microenvironment)를 제공한다고 하였다.

태자와 성체의 상처치유 기전의 차이점 규명을 위

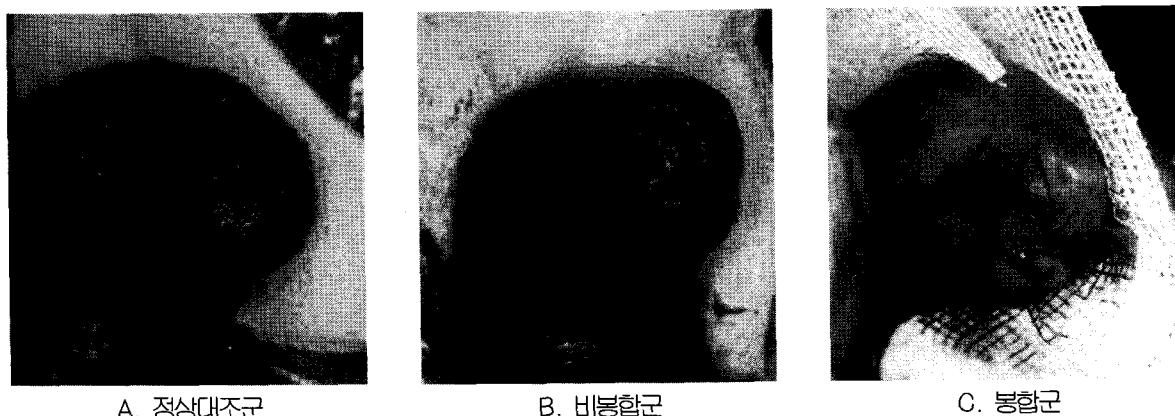


그림 1. 술후 7일째에 희생시킨 태자의 사진.

한 연구에서 태자의 비반흔성 조직복원력과 세포외기질의 역할을 연관지어 해석하려는 노력이 진행중에 있으나, 각 실험 동물종간의 차이 및 세포외기질 구성요소의 다양성등으로 인한 많은 변수가 아직 미결의 과제로 남아 있다. 따라서 본 연구의 목적은 토끼 태자의 상순부에 형성시킨 구순열상의 치유과정에서 반흔조직의 형성과 관련이 있는 세포외기질의 주요성분인 교원질 I, III, IV, V형, fibronectin, laminin의 시기적 출현 및 분포양상을 조사하기 위한 것이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험동물과 수술방법

실험 동물로 임신한 토끼(New Zealand White Rabbit)를 선택하였다. 성숙한 암수를 합사하였고, 다음날 질도말에서 양성인 암컷을 수임 0일로 정하였다. 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 노출시키고 각

자궁낭에 위치한 태자의 크기와 수를 확인하였다. 수술을 시행할 태자의 선정은 Oberg³⁷⁾와 백과양²⁾의 방법을 참조하였다.

자궁표면에서 태자를 촉진하여 태자의 머리부분을 확인한 후, 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 융모막을 순차적으로 절개하였다. 이때 그 크기는 주둥이만을 노출시킬 정도로 최소한으로 하였다.

8배의 확대경 하에서 우측 비공저의 중앙부에서 직하방으로 인중(clefted philtrum)에 평행하게 전층두께(full thickness)로 iris scissor를 사용하여 절개를 가하였다. 그리고 입술부위에서 폭이 0.5 mm가 되게 삫기(wedge)형태로 2차 절개를 다시 가하여 조직을 제거함으로서 구순열과 유사한 상처를 만들었다.

태자는 인위적으로 만든 구순열을 봉합하지 않은 군(비봉합군 : 20마리), 봉합한 군(봉합군 : 20마리), 정상대조군(sham operation group : 20마리)으로 나누었다. 비봉합군은 봉합을 하지 않고 상처말단부(wound edge)를 근접만 시켰다. 봉합군은 9-0 ethilon(Ethicon, 직경 100 마이크론) 봉합사를 사용하여 코와 입술의 경계를 정확히 접합시키도록 주의하여 단순 interrupted suture를 시행하였다. 정상대조군은 태자에 구순열을 형성하거나 봉합수술을 하지 않고 노출만 시켰다가 밀어넣었다.

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

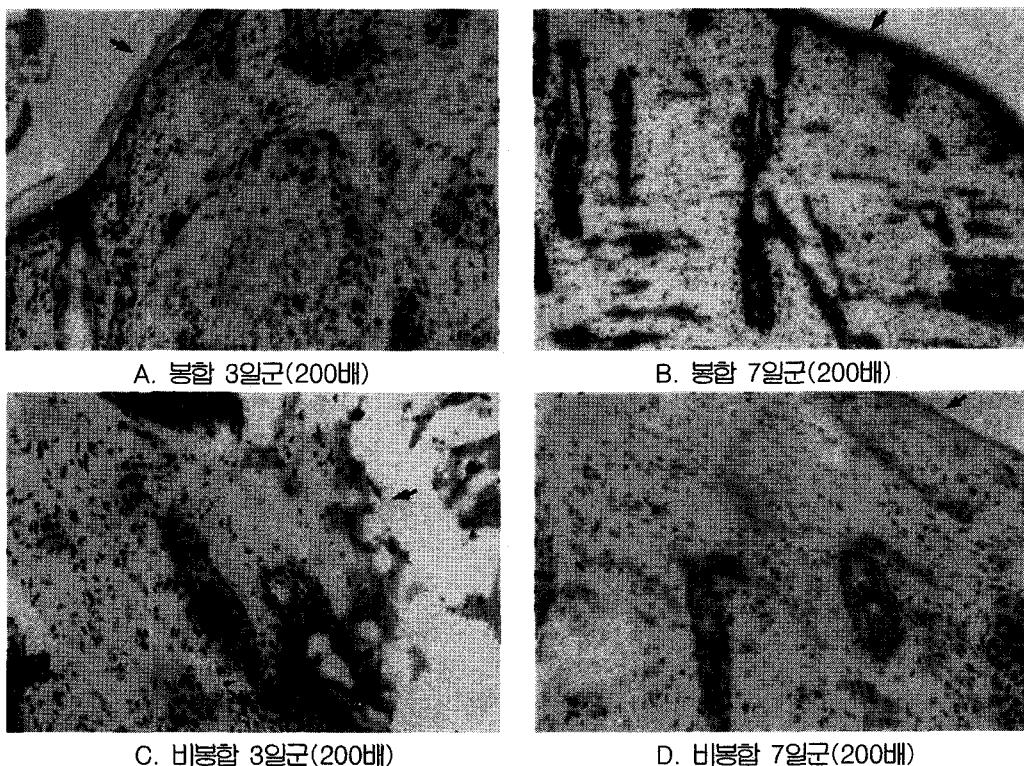


그림 2. H & E 염색소견(절개부위는 회살표로 표시하였다.)

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 젠타マイ신액(0.1 mg/ml saline)으로 세척하였다.

2. 육안소견 관찰과 조직표본 제작

수술후 1, 2, 3, 5, 7일째에 pentobarbital을 과투여 하여 어미를 희생시킨 후 세왕절개(Caeserean 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 희생시키고 두경부를 알루미늄 호일에 싸서 액체 질소 탱크에 순간적으로

냉동하고 Tissue-Tek OCT compound(Miles Inc., 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% H₂O₂를 10분동안 처리하여 비활성화시키고 증류수와 PBS로 세척하였다. 조직절편은 Zymed사의 Histostain-SP kit의 blocking agent로 10분간 처리하였고, 교원질 I, III, IV, V형, fibronectin, laminin의 각각에 대한 일차항체를 제조회사의 지시대로 희석하여 조직절편위에 떨어뜨린 후 섭씨 4도에서 다음날 아침까지 12시간동안 배양하였다(표 1).

PBS로 세척한 후 Histostain-SP kit(Zymed사)의



A. 정상 5일군(200배)

B. 봉합 3일군(200배)

C. 봉합 5일군(200배)

그림 3. fibronectin 염색소견(절개부위는 화살표로 표시하였다.)

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. 교원질 침착과 반흔조직형성정도
3. 신생혈관 형성 정도
4. 교원질 I, III, IV, V형, fibronectin, laminin의 존재 유무
5. 교원질 I, III, IV, V형, fibronectin, laminin의 균열, 시간별 분포차이 비교

III. 연구성적

1. 수술성공률

본 실험에서 총 20마리의 임신한 어미토끼를 수술하였는데 조산, 수술중 사망, 태자전체사망으로 인해 실패한 4마리를 제외한 16마리의 임신한 어미토끼에서 수술이 성공하였다. 상기 16마리의 임신한 어미 토끼에서 태자 수술이 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 보였

표 1. 일차항체

primary antibody raised against	Antibody type	Source	Dilution (in PBS)
교원질 I형	Monoclonal	Chemicon	1 : 50
교원질 III형	Monoclonal	Monosan	1 : 50
교원질 IV형	Monoclonal	Serotec	1 : 50
교원질 V형	Monoclonal	Monosan	1 : 50
laminin	Monoclonal	Chemicon	1 : 50
fibronectin	Monoclonal	Serotec	1 : 50

다(표 2).

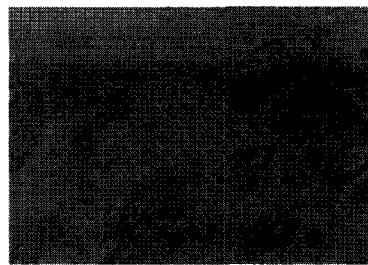
2. 안면부의 육안소견

수술후 2일째 희생시킨 군에서 비봉합군은 구순열부위에서 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.

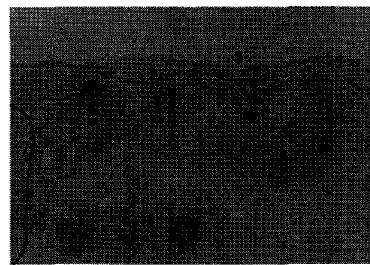
수술후 7일째 희생시킨 군에서는 비봉합군은 여전히 구순열부위에 선상의 함몰 변형이 잔존해 있었으나 재융합이 발생하여 재상피화가 되어 있었다. 그러나 코는 약간 편평하게 되어 있었고 안모는 비대칭적이었다. 봉합군에서는 수술부위에 완전한 융합이 발생하였고 재상피화가 잘 형성되었으며 코와 안면비대칭은 거의 없었고 입술의 형태도 정상적이었다(그림 1).

표 2. 각 군별 생존률

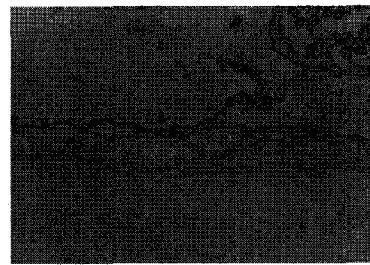
	1일	2일	3일	5일	7일	계
정상대조군	2/2 마리	2/3 마리	4/4 마리	3/3 마리	3/4 마리	14/16 마리
봉합군	2/3 마리	2/4 마리	3/3 마리	3/3 마리	3/3 마리	13/16 마리
비봉합군	1/2 마리	2/4 마리	3/3 마리	3/4 마리	2/3 마리	11/16 마리
계	5/7 마리	6/11 마리	10/10 마리	9/10마리	8/10마리	38/48 마리



A. 정상 5일군(200배)

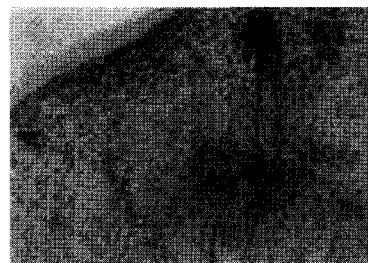


B. 봉합 5일군(200배)

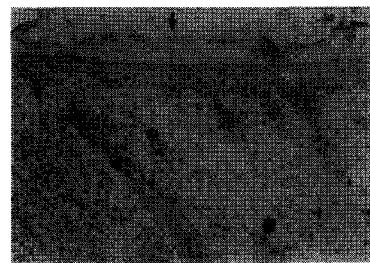


C. 봉합 5일군(200배)

그림 4. laminin 염색소견(절개부위는 화살표로 표시하였다.)



A. 정상 2일군(200배)



B. 봉합 7일군(200배)



C. 미봉합 7일군(200배)

그림 5. 교원질 IV형 염색소견(절개부위는 화살표로 표시하였다.)

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 2-A). 봉합 7일군에서는 수술부위의 상피가 얇은 것을 제외하고는 표피부속기(예 hair follicle 형성)와 근육조직, 혈관등에서 재생이 일어났다(그림 2-B). 비봉합 2일군에서는 파열부와 그 내부에 clot이 존재하였으나, 비봉합 3일부터는 주위의 정상조직에 비해 세포들이 조

밀하지는 않았지만 파열부주위의 결체조직내에는 간엽조직세포들이 보였으며, 표피부속기와 재상피화의 불완전한 회복을 보이는 점진적인 상처 치유가 진행되었다(그림 2-C). 비봉합 7일군에서는 파열부의 상피가 약간 얇고 hair follicle 형성과 근육조직의 발달이 인접 정상조직에 비교하여 약간 작았으나 근섬유, 혈관등에서 장애가 되는 표식은 없었다(그림 2-D). 비봉합군은 재상피화가 봉합군에 비해서 다소 늦었으나 봉합군과 비봉합군 모두에서 전기간동안 염증소견을 보이지 않았다.

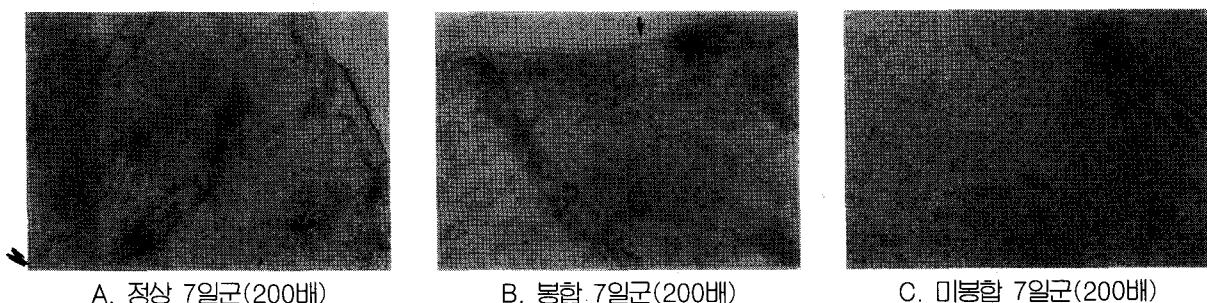


그림 6. 교원질 I형 염색소견(절개부위는 화살표로 표시하였다.)

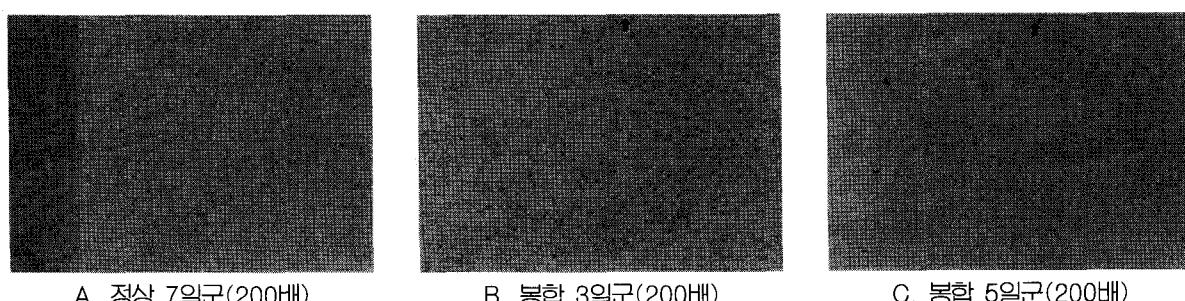


그림 7. 교원질 III형 염색소견(절개부위는 화살표로 표시하였다.)



그림 8. 교원질 V형 염색소견(절개부위는 화살표로 표시하였다.)

4. Fibronectin

Fibronectin의 염색소견은 정상대조군에서 세포외기질내에 diffuse하게 분포하였다. 봉합군과 비봉합군에서는 fibrin clot과 창상 기저부 및 창상연을 따라 비교적 균일하게 침착되는 양상을 관찰할 수 있었으며, 3일군까지는 염색소견의 증가를 보였으나 그후 재상피화가 완성되면서 fibronectin의 염색소견이 감소하여 5일군이후에서는 인접 정상조직과 정상대조

군과 차이를 보이지 않았다(그림 3, 표3).

5. Laminin과 교원질 IV형 염색소견

Laminin과 교원질 IV형은 혈관의 기저막에 분포되어 있다. 그러므로 상처 치유과정중 신생혈관의 생성은 혈관의 기저막(endothelial basement membrane)에 국한되어 있는 laminin과 교원질 IV형에 대한 염색으로 확인할 수 있다. 봉합군과 비봉합군 모두에서

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

생식시기 단계	Intercellular	laminin	교원질 I	교원질 II	교원질 IV형	교원질 V형
1	증가(++)	없음(-)	없음(-)	없음(-)	없음(-)	없음(-)
2	증가(++)	없음(-)	없음(-)	없음(-)	없음(-)	없음(-)
3	증가(++)	없음(-)	약간증가(+)	약간증가(+)	증가(++)	약간증가(+)
5	약간증가(+)	차이없음(O)	차이없음(O)	차이없음(O)	약간증가(+)	약간증가(+)
7	차이없음(O)	차이없음(O)	차이없음(O)	차이없음(O)	차이없음(O)	차이없음(O)

인접한 정상조직에 비해서 신생혈관의 과도한 생성 소견을 보이지 않았다(그림 4, 5, 표3).

상피의 기저막에서 IV형 교원질의 염색소견은 봉합군과 비봉합군 모두에서 1, 2일군보다 상피화가 진행되는 3일군이후에서 약간 증가하였으나 재상피화가 완성되는 5일경에 새로 형성된 기저막에서 교원질 IV형의 염색소견이 정상 유형으로 회복되어 인접한 정상조직이나 정상대조군과 유사한 모습을 보였다(그림 5). 상피 기저막에서 laminin의 염색 소견은 5일군에서 발견되었고 염색정도는 증감없이 7일군까지 유지되었다(그림 4).

6. 교원질 I, III, V형 염색소견

교원질의 생성과 반흔형성정도를 파악하기 위하여 교원질 I, III, V형에 대하여 면역조직화학적 염색을 사용하여 검정하였다. 태아조직에 특히 많이 존재하는 교원질 III형은 정상대조군의 간엽 및 결체조직내에 광범위하게 분포하였다. 봉합군과 비봉합군에서 수술부위의 염색정도는 2일군까지는 발견되지 않았으나 3일군이후 존재하였고 같은 시기의 정상대조군에 비해서 증가하지 않았으며(그림 7), 교원질 I, V형도 거의 동일한 소견을 보였다(그림 6, 8, 표3).

IV. 총괄 및 고안

본 실험에서 실험 동물로 임신한 토끼(New Zealand and 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 종반에 해당되기 때문이었다. 또한 태자의

사망률을 최소로 하기 위하여 어미 1마리당 2-4마리 평균 3마리의 태자에 대해서만 실험을 시행하였다. 수술에 대한 태자의 생존력은 표 2에 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.

1. 육안소견과 H & E 염색소견

봉합군과 비봉합군 모두에서 전기간 동안 염증소견은 보이지 않았으며, 이것은 Krummel^{23,24)}과 Longaker^{30,31)}와 동일한 실험결과를 보였다. 육안소견(그림 1)과 H & E 염색소견(그림 2) 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. 5일군이후에 근육의 재생이 보였고, 이것은 태자의 근육상처에서 재생된 근육의 다발(bundle)이 상처부위에서 단절되거나 반흔조직과 겹쳐지지 않고 치유됨을 보인 Rowsell³⁸⁾의 결과와 일치하였다. 따라서 구순팔약근이 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 Rowsell³⁸⁾, Whitby와 Ferguson⁴⁹⁾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.

2. Fibronectin

정상대조군에서 fibronectin의 염색소견은 세포외기질내에 diffuse하게 분포하였고 현저한 염색소견은 볼 수 없었다. 봉합군과 비봉합군에서는 fibrin clot과 창상 기저부 및 창상연을 따라 비교적 균일하게 침착되는 양상을 관찰할 수 있었으며, 3일군까지는 염색소견의 증가를 보였으나 그후 재상피화가 완성되면서 fibronectin의 염색소견이 감소하여 5일군이후에서는 인접 정상조직과 정상대조군과 차이를 보이지 않았다(그림 3). 이것은 태자, 신생, 성숙 토끼와 백서의 상순부에 형성한 창상에서의 fibronectin의 시간별 침착에 관한 노¹⁾와 Whitby와 Ferguson⁴⁹⁾과 동일한 결과를 보였다.

Fibronectin은 교원질과 fibrinogen에 결합할 수 있고, 섬유아세포의 표면에도 부착이 가능하기 때문에 세포의 부착, 전개(spreading), 성장을 촉진한다. 그리고 섬유아세포와 단핵구에 화학주성을 유도하며 수성단계(fluid phase)에서는 혈관내피세포에 대해서도 화학주성을 가진다⁷⁾. Kurkinen 등²⁵⁾이 백서의 육아조직에서 fibronectin과 교원질의 순차적인 출현을 보고한 후로 Clark 등¹¹⁾이 guinea pig의 피부상처에서 fibrin, fibronectin을 함유한 임시 기질(provisional matrix)위로 상피세포의 이동을 입증하는 등 창상치유과정에 있어서 fibronectin의 역할 및 중요성은 그의 많은 실험을 통하여 보고된 바 있다.

섬유아세포 및 표피세포에서부터 형성된 fibronectin의 침착이 fibrin응괴와 연관되어 출현하는 점에서 태자와 성숙개체와 동일한 기전을 갖지만 태자의 경우에는 그 출현이 창상치유의 매우 초기에 일어난다는 차이점을 보이고 있다²⁸⁾. 그리고 상처치유시 생성되는 fibronectin은 여러가지 다른 기능적 형태의 fibronectin 중 배아발생단계시 주를 이루는 배아형이 대부분이며⁹⁾, fibronectin이 잘 결합되는 신생 교원질은 태아조직에 많은 교원질 III 형으로 알려져 있다.

상처치유과정중 염증단계에서 증식단계로의 원활한 변화의 지표로 여겨져온 대식세포는 가장 먼저 fibronectin m-RNA를 형성하는데 이는 특징적으로 상피세포의 이동경로를 따라 일어나는 것으로 알려져 있다. 이는 이동중인 상피세포의 기저부에 표출되는 b1-intergrin과 밀접한 관계를 가지면서 재상피화의 완성에 중요한 기전으로 받아들여진다. 따라서 태자

창상에서의 조기 상피화는 위와 같은 맥락에서 fibronectin과 긴밀한 연관관계가 있으리라 추측할 수 있으며, 노의 실험¹⁾에서도 태자 창상의 비교적 조기 상피화를 관찰 할 수 있었다. 또한 fibronectin의 단핵구에 대한 선택적 주화작용을 고려해 볼 때 태자 상처에서의 다형핵 백혈구 세포(polymorphonuclear leukocyte)의 출현이 최소한으로 발생한 원인중의 하나로 유추할 수 있을 것이다.

염증이나 상처치유과정에서 미세혈관이 증식되고 수복될 때 미세혈관에서 fibronectin의 발현이 현저히 증가하였다¹¹⁾. 따라서 활발히 증식하는 혈관내피세포에 의해서 fibronectin이 생성된다고 볼 수 있다. Tonnesen 등⁴⁶⁾은 태자 및 성숙개체의 피부 모세혈관 fibronectin 분포에 관한 연구에서 태자의 점진적인 발달과 함께 성숙개체에 비해 더 많은 양의 fibronectin의 검출을 보고한 바 있다. 그들은 임신 중기의 인간태아의 피부 미세혈관에서 fibronectin의 발현이 현저하였으나 성숙과 더불어 감소하였고 laminin은 발육동안 일정하게 나타났다고 하여, 발육중이거나 재생중인 혈관에서 증가된 fibronectin은 신생혈관형성시 혈관내피세포의 이동과 증식을 촉진하고 혈관의 조절(modulation)과 형태발생(morphogenesis)에서 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다⁴⁶⁾.

또한 태자 상처의 외부환경을 이루고 있는 양수에는 다량의 fibronectin이 함유되어 있어서, 태자의 상처는 계속적으로 fibronectin에 노출될 수 있는 기회가 많을 뿐만 아니라 국소적으로 도포한 fibronectin이 백서에 있어서 창상치유를 촉진한다는 보고⁹⁾도 있다.

3. Laminin

Laminin은 혈관과 상피의 기저막에 존재하는 비교원질성 glycoprotein이다.

혈관 기저막에 대한 laminin의 염색소견은 봉합군과 비봉합군의 3일군 이후 염색의 정도가 정상대조군에 비하여 증가하지 않았으므로 신생혈관의 과도한 생성소견이 없었다고 생각된다(그림 4). 본 실험의 결과는 laminin 침착에서 차이를 보이지 않았다고 한 Longaker²⁸⁾의 결과나 laminin이 임신 6-7주경에 인간태아 피부의 미세혈관에 존재하고 발육동안 변하지 않았다고 한 Fine¹⁷⁾의 결과와도 비교해볼 때 동일한 결과를 보였다.

상피 기저막에 대한 laminin의 염색소견은 봉합군과 비봉합군의 5일군 이후에서 발견되었고 염색 소견

정도는 증감없이 일정하였다는 본 실험결과는 피부 상처에서 상피세포가 fibrin, fibronectin을 함유한 임시기질위로 이동할 때에는 정상적인 기저막의 성분인 교원질 IV형, laminin이 없었고, 재상피화가 완성된 이후에 기저막이 두꺼운 모습을 띠고, fibrin, fibronectin이 사라진 후 정상적인 성숙한 기저막에서 교원질 IV형, laminin이 다시 나타난다고 생각되며, 이들은 정상 상피가 하부의 진피에 anchoring되는 것을 중개한다고 생각된다.

4. 교원질 IV형

교원질 IV형은 상피의 기저막과 혈관의 기저막에 국소적으로 분포하며 다른 비교원질성 기저막의 성분인 laminin, nidogen, heparan sulphate proteoglycan 등과 상호연결되는 골격(scaffold)역할을 한다. 그리고 basal keratinocyte가 교원질 IV형에 부착되는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서는 재상피화가 완성되고 난후에 새로 형성된 기저막에 교원질 IV형의 염색 소견이 발견되었다(그림 5). 따라서 약 3일군 이후에 상처의 재상피화가 발생한 후 기저막이 형성되는 것으로 생각되며 이것은 상피 하부의 basal lamina의 구성성분인 교원질 IV형, laminin, heparan sulphate등이 형성되기 전에 재상피화가 완성되었다는 Whitby와 Ferguson⁴⁹⁾이나 Stanley등⁴²⁾의 결과가 본인의 연구결과와도 일치하였다.

봉합군과 비봉합군의 상처에서 혈관 기저막의 교원질 IV형에 대한 염색은 3일군에서 1, 2일군보다 약간 증가하였으나 인접정상조직이나 정상대조군과 차이를 보이지 않았다(그림 5). 따라서 성체의 상처 치유과정에서 볼 수 있는 신생혈관의 과도한 형성은 없었던 것으로 생각되며, Whitby와 Ferguson⁴⁹⁾의 실험 결과와 일치하였다.

태자상처에서 신생혈관의 생성증기가 없었던 이유로는 첫째 angiogenic factor가 상처부위에서 존재하지 않거나, 둘째 세포들이 이들 인자에 대해서 반응하지 않거나, 셋째 현저한 염증반응이 없는 것이 신생혈관 생성자극의 부족과 관련이 있을 수 있다는 등으로 생각해 볼 수 있다^{19,38)}. 백과양의 실험결과²⁾에서 angiogenic factor의 일종인 bFGF가 상처부위에서 존재하였고, 그 정도가 정상대조군과 차이가 없었으므로 첫째 가능성보다는 둘째와 셋째 가능성성이 더 높다고 생각된다.

5. 교원질 I, III, V형

교원질 I, III, V 형은 교원질 합성의 증가와 반흔조직의 형성유무를 확인하기 위하여 조사하였다. 본 연구에서 교원질 I, III, V 형은 결합조직에서 넓게 분포되어 있었고, 봉합군과 비봉합군에서 수술부위의 염색정도는 2일군까지는 발견되지 않았으나 3일군이후 존재하였고 같은 시기의 정상대조군에 비해서 증가하지 않아서 교원질 I, III, V 형의 과도한 형성증가는 없었으며 따라서 반흔조직의 형성은 없었던 것으로 생각된다(그림 6, 7, 8). 그리고 이 결과는 쥐태자실험에서 교원질 III형은 48시간이후 보이기 시작하여 72시간 후 망상형의 염색소견을 보였고 인접 주위조직과 구별 할 수 없었으며 교원질 I, V형도 동일한 양태를 보였다고 한 Whitby와 Ferguson의 연구⁴⁹⁾와 같은 결과를 보였다.

태자 조직의 무반흔 형성 치유 원인중 교원질과 관련된 연구로는 성체조직과의 교원질 유형의 차이, 교원질 fibril 크기의 차이, hyaluronic acid와 chondroitin sulphate의 존재⁴⁰⁾, 섬유아세포 이동속도의 차이, 섬유아세포의 분화정도^{40,48,49)}등이 있다.

태자 상처치유과정에 관한 여러 선학들의 연구에서 교원질의 침착에 대하여 상반된 결과를 보이고 있다. Krummel²⁴⁾, DePalma¹⁴⁾, Rowsell³⁸⁾는 태자 상처 치유과정에서 교원질의 침착이 최소한이거나 없었다고 한 반면, Adzick⁵⁾, Burd⁸⁾, Whitby와 Ferguon⁴⁹⁾는 교원질 합성 증가를 보고하였다. Adzick⁵⁾과 Siebert³⁹⁾는 Goretex를 사용한 토키태자실험에서 hydroxyproline의 생성 증가를 발견하여 교원질 합성을 주장하였으나, Krummel²⁴⁾은 토키태자의 PVA/silastic wound model에서 hyaluronic acid은 많이 발견되었으나 교원질과 hydroxyproline의 검출이 없었다고 하였다. 토키 태자를 사용한 상기 연구들에서 이러한 대조적인 결과가 나타난 것은 세포외기질의 환경에 영향을 줄 수 있는 인공적인 환경을 제공하는 implant의 종류 차이에 기인한 것으로 생각된다. Longaker³⁰⁾는 양을 대상으로 교원질 I, III, IV, VI형에 대한 면역조직화학 연구를 시행하여 태아조직에서 좀더 빠른 침착을 보였고 상처면에 평행하게 침착된 후 개조되어 정상적인 진피와 간엽조직의 유형을 보였다고 하였다. 따라서 Masson's trichrome 염색으로 태자, 신생, 성숙백서의 창상조직에서 교원질이 검출되지 않았다고 한 노¹⁾의 연구결과는 교원질 검출방법의 기술적인 문제 또는 실험동물차이에 기인한 것으로 생각된다.

된다.

따라서 문헌고찰과 저자들의 연구²⁾ 및 본 실험결과에 의하면 태자 상처 치유과정중 교원질의 합성은 존재하는 것으로 생각된다. 그렇다면 교원질생성에도 불구하고 태자 상처에서 무반흔성 치유가 되는 원인은 다음과 같이 생각해볼 수 있을 것이다.

첫째, 태아와 성체의 세포외기질은 glycoprotein, 교원질 I, III, IV, V, VI형, proteoglycan 등의 공통된 구성요소를 가지나 이들 요소들의 침착시기와 유형이 다르다. 특히 태아 상처에서 교원질(interstitial collagen type I, III, V)은 망상형으로 침착되어 주위의 정상적인 조직과 구분이 되지 않으나, 성체의 상처에서는 굵고 평행한 다발의 교원질이 상처면에 수직으로 침착되어 반흔조직이 발생된다고 하여 교원질 침착유형의 차이를 주장하였다⁴⁹⁾.

교원질 침착유형의 차이를 보이는 이유는 다음과 같은 기전으로 설명할 수 있다. 태자 상처의 섬유아세포는 glycosaminoglycan(hyaluronic acid와 proteoglycan), glycoprotein등이 풍부한 느슨한 별집모양의 격자(loose honeycomb wound lattice)내로 빠르게 이동하여 교원질 섬유를 빠르게 침착시킨다. 이때 외력에 변형되기 쉬운 부드러운 세포외기질(compliant matrix)내에서 섬유아세포를 견인(traction)하여 소섬유(fibril)에게 기계적인 힘이 전달되면 정상적인 진피(dermis)와 유사하거나 동일한 망상형으로 섬유의 침착방향을 배열할 수 있게 된다. 그러나 성체 상처는 더 견고하고 외력에 대한 저항이 강한 세포외기질(denser, more resistant matrix)이므로 섬유아세포의 이동이 느리게 되어 상처의 내부골격(wound scaffold)보다는 상처변연부의 상하로 더 쉽게 이동한다. 따라서 더 단단한 세포외기질과 근섬유아세포(myofibroblast)에 의해 생성된 상처부위의 수축(wound contracture)이 교원질 섬유의 침착방향을 반흔조직의 비정상적인 침착방향으로 변경시킬 수 있다. 즉 섬유아세포의 이동속도와 세포외기질의 내부골격(scaffolding)의 차이가 교원질침착 유형과 관계가 있다는 것이다.

둘째, 교원질의 섬유형성(fibrillogenesis)과정에 영향을 주는 세포와 세포외기질의 환경 차이에 의하여 태자와 성체의 교원질 섬유의 직경과 형태 차이를 보인다. 태자조직은 교원질 I형보다 교원질 III형을 더 많이 포함하며 이것이 교원질 섬유 크기에 영향을 준다고 하였다. Burd등⁸⁾은 태자 양의 상처 조직에서 성숙 양에 비하여 보다 많은 교원질의 침착 및 hydro-

xypoline함량을 볼 수 있었다고 하였다. 실제로 실험관내 실험을 통하여 태자의 섬유아세포가 성체의 섬유아세포보다 교원질 합성능력이 월등한 것으로 증명되었으며, 이렇게 태자에 있어서 교원질이 풍부한 창상치유를 보이면서도 반흔이 관찰되지 않는 기전으로는 hyaluronic acid등이 풍부한 기질이 제공됨에 따라 교원질이 규칙적으로 배열될 수 있는 환경이 마련되며 때문이라는 실험결과가 보고되고 있다. 그리고 양수와 태자 상처에는 hyaluronic acid가 많으며^{15,24,29)} hyaluronic acid를 성체의 고막(tympanic membrane)상처에 국소도포한 경우 반흔 형성이 감소하였고 교원질 구성 정도를 변화시켰다. Scott와 Hughes⁴⁰⁾은 hyaluronic acid가 풍부한 시기에는 소와 닭의 태자의 교원질 섬유 직경이 작았고 hyaluronic acid와 chondroitin sulphate가 감소함에 따라 직경크기의 증가가 일어났다고 하였다. 또한 Longaker³⁰⁾는 glycosaminoglycan이 풍부한 세포외기질에 의해서 태아상처에서 교원질합성이 조절될 수 있다고 하였다. 즉 교원질, proteoglycan, fibronectin, hyaluronic acid등이 존재하면 상호작용에 의하여 태자의 교원질 섬유 직경과 형태를 변화시켜 교원질이 규칙적으로 배열될 수 있는 환경이 마련된다는 것이다.

셋째, 태아의 상처에서 세포외기질중 hyaluronic acid 침착이 무반흔성 치유에 기여한다. DePalma 등^{14,15)}, Krummel등²⁴⁾은 성체와 태자에 PVA sponge를 삽입한 후 태자에서 더 많은 양의 glycosaminoglycan을 발견하였고 그것의 주 성분이 hyaluronic acid라고 하였다. 그런데 성체의 상처에서는 hyaluronic acid의 초기 침착후 hyaluronidase가 생성되어 hyaluronic acid가 제거되므로 hyaluronic acid의 일시적인 증가만을 보이고 교원질로 대체된다. 그리고 Longaker³⁰⁾, Whitby와 Ferguson⁴⁹⁾, 안³⁾, 정⁴⁾등의 실험에서 태자의 상처치유시 전 치유과정을 통해 hyaluronic acid의 증가를 관찰하였다. 상기와 같이 태아의 상처에서는 hyaluronic acid가 지속적으로 높은 수준의 침착을 보이는 이유로는 양수, 태아의 혈청과뇨(urine), 상처액(wound fluid)내에 존재하는 55kD정도의 hyaluronic acid stimulating activity(HASA)를 가지는 glycoprotein에 의한 내부기전²⁹⁾과 양수에 존재하는 hyaluronic acid¹³⁾가 태아상처에 직접 도포되는 외부기전³³⁾때문이라고 하였다.

태아의 상처에서 지속적인 높은 수준의 hyaluronic acid 침착이 어떤 방식으로 무반흔성 치유에 기여하는지에 대한 연구가 진행되었다. Alaish⁶⁾는 태아의

섬유아세포(fetal fibroblasts)가 성체의 섬유아세포(adult fibroblast)보다 세포표면의 hyaluronic acid 수용기의 밀도가 증가해 있다고 하면서 태아조직의 수복(repair)은 빠르고 조정된(coordinated) 세포이동이 필요하므로 교원질로 주로 구성된 제한된 고체성 기질(restrictive matrix)보다는 hyaluronic acid가 풍부한 수성(fluid) 세포외기질을 요구된다고 하였다. Vogel⁴⁶⁾은 hyaluronic acid가 풍부한 세포외기질이 태아상처에서 교원질 섬유의 규칙적인 침착을 허용하는 환경을 제공하는 반면 성체상처 세포외기질에서 교원질 섬유는 왜곡되고 무성형의 반흔 형태(distorted, unorganized scar pattern)로 배열된다고 하였다. Mast³⁵⁾는 창상 치유과정중 나타나는 hyaluronic acid를 hyaluronidase를 이용해 생화학적으로 제거했을 때 반흔 형성을 주된 작용을 하는 것으로 알려진 섬유증식(fibroplasia), 교원질 침윤 및 신생혈관화등이 증가된다고 하였다. 따라서 hyaluronic acid가 반흔 형성을 억제시키는 기전에 기여할 것이라고 추측할 수 있다.

넷째, fibronectin등이 풍부한 태자 상처의 세포외기질이 임시기질로서 작용하여 빠른 재상피화와 신생혈관형성등에 기여하기 때문으로 생각된다.

임신 3기 중반기 이후부터 말기에는 태자의 상처치유가 무반흔성 치유에서 반흔성 치유로 전환되는데 이 경우 급격한 전환이 아니라 완만한 전환(spectrum)을 보인다. 이것은 성체와 태자간의 다인성 차이(multifactorial differences)를 가리키며 상처융합의 속도, 염증 반응의 정도, 면역체계의 성숙도와 능력(competence), 상처조직의 구성과 분화정도, 세포외기질의 구성, 성장인자등이 풍부한 양수, 조직산소분압의 차이, 상처 조직의 대사와 pH, 기능시 조직의 신장(tension)정도, 급성염증의 존재유무, 상처의 종류와 크기, 조직의 종류 등과 같은 요소들에 의하여 좌우된다.

상처 치유에 관련된 일련의 과정들은 손상부위 조직의 염증, 면역, 간엽세포들과 TGF- β , PDGF, bFGF 등 여러 가지 성장인자와 교원질, hyaluronic acid, fibronectin, laminin등과 같은 세포외기질 구성성분들간의 상호작용에 의하여 이루어지고 있다. 백과 양의 실험²⁾과 본 실험의 결과를 종합해보면 태아 상처 치유과정에서 염증반응이 거의 없었고 성장인자와 화학주성물질의 분비량이 작아서 성체의 상처에 비해 대식세포와 섬유아세포가 상처내로 적게 동원, 증식되고 세포외기질의 합성과 배열등에 상호작용하여

무반흔성 치유를 일으킨다고 간접적인 추론을 할 수 있게 한다.

V. 결 론

본 연구의 목적은 태자의 상처 치유과정에서 반흔 조직의 형성과 관련이 있는 수종 세포외기질의 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 희생시켜 상처치유에 관한 육안적 소견과 H & E 염색소견 및 교원질 I, III, IV, V형, fibronectin, laminin에 대한 면역조직화학적 염색 소견을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 봉합군과 비봉합군에서 전기간동안 염증반응은 없었다.
2. 비봉합군의 재상피화가 봉합군에 비해 다소 느렸다.
3. 교원질 I, III, V형은 봉합군과 비봉합군에서 2일군 까지는 발견되지 않았고 3일군이후 존재하였으나 염색정도가 인접정상조직이나 정상대조군에 비하여 증가하지 않았다.
4. 상피 기저막에서 교원질 IV형의 염색소견은 봉합군과 비봉합군에서 3일군이 다소 증가하였으나 그 후 감소하여 인접정상조직이나 정상대조군과 차이가 없었고, laminin의 염색 소견은 봉합군과 비봉합군에서 5일군이후 발견되었고 염색정도의 증감없이 7일군까지 유지되었고 인접정상조직이나 정상대조군과 차이가 없었다.
5. 혈관내피세포 기저막에서 laminin과 교원질 IV형의 염색소견은 인접정상조직이나 정상대조군에 비해서 증가하지 않았다.
6. Fibronectin은 봉합군과 비봉합군에서 fibrin clot과 창상 기저부 및 창상연을 따라 3일군까지 염색소견이 증가하였다가 그후 감소하여 인접정상조직이나 정상대조군과 차이가 없었다.

참고문헌

1. 노태석, 나동균, 양우익 등 : 태자, 신생 및 성숙 백서의 창상에서 fibronectin침착 양상에 관한 연구. 대한성형외과학회지 23 : 39-46, 1996

2. 백승학, 양원식 : 토끼 태자에 형성시킨 구순열상의 치유과정에서 수종 성장인자들의 분포에 관한 연구. 대치교지 27 : 683-696, 1997
3. 안성진, 백무현, 김승홍 등 : 외상에 대한 초기반응에 있어서 가토 태아와 성숙가토의 비교. 대한성형외과학회지 23 : 867-875, 1996
4. 정승문, 이진, 황육배 등 : 가토 태아의 구순열 교정 및 면역조직화학적 연구. 대한성형외과학회지 23 : 28-38, 1996
5. 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
6. Alaish SM, Yager D, Diegelmann RF et al : Biology of fetal wound healing : Hyaluronate receptor expression in fetal fibroblasts. J Pediatr Surg 29 : 1040-1043, 1994
7. Bowersox JC, Sorgente N : Chemotaxis of aortic endothelial cells in response to fibronectin. Cancer Res 42 : 2547-2551, 1982
8. Burd DAR, Longaker MT, Adzick NS, et al : Fetal wound healing in a large animal model : The deposition of collagen is confirmed. Br J Plast Surg 43 : 571-577, 1990
9. Cheng CY, Martin DE, Leggett CG : Fibronectin enhances healing of excised wounds in rats : Arch Dermatol 124 : 221, 1988
10. Clark RA et al : Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound closure. J. Invest. Dermat. 79 : 264- 276, 1982
11. Clark RAF, DellaPelle P, Manseau E et al : Blood vessel fibronectin increase in conjunction with endothelial cell proliferation and capillary ingrowth during wound healing. J invest Dermatol 79 : 269-276, 1982
12. Clark RA : Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair. Arch Dermatol 124 : 201-206, 1988
13. Dahl L, Hopwood JJ, Laurent BG, et al : The concentration of hyaluronate in amniotic fluid. Biochem Med 30 : 28 -283, 1983
14. DePalma RL, Krummel TM, Nelson JM, et al : Fetal wound matrix is composed of proteoglycan rather than collagen. Surg Forum 38 : 626-628, 1987
15. DePalma RL, Krummel TM, Durham LA, et al : Characterization and quantification of wound matrix in fetal rabbit. Matrix 9 : 224-231, 1989
16. Dodson TB, Schmidt B, Longaker MT, et al : Fetal cleft lip repair in rabbits : postnatal growth after repair. J Oral Maxillofac Surg 49 : 603-611, 1991
17. Fine JD, Smith LT, Holbrook KA, et al : The appearance of four basement membrane zone antigens in developing human fetal skin. J Invest Dermatol 83 : 66-69, 1984
18. Frantz FW, Mast BA, Diegelmann RF, et al : Rapid restoration of breaking strength in healing fetal rabbit wounds. Surg forum 42 : 661-663, 1991
19. Hallock GG : In utero cleft lip repair in A/J mice. Plast Reconstr Surg 75, 785-788, 1985
20. Hallock GG, Rice DC, McClure HM : In utero cleft lip repair in the rhesus monkey : An update. Plast Reconstr Surg 80 : 855-858, 1987
21. Hynes R : Molecular biology of fibronectin. Ann Rev Cell Biol 1 : 67- , 1985
22. Kaban LB, Dodson TB, Longaker MT, et al : Fetal cleft lip repair in rabbits : Long-term clinical and cephalometric results. Cleft Palate J 30 : 13-21, 1993
23. Krummel TM, Nelson JM, Diegelmann RF, et al : Wound healing in the fetal and neonatal rabbit. Surg Forum 37 : 595-596, 1986
24. Krummel TM, Nelson JM, Diegelmann RF, et al : Fetal response to injury in the rabbit. J Pediatr Surg 22 : 640-644, 1987.
25. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ : Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. Lab Invest 43 : 47-51 , 1980
26. Kujawa MJ, Tapperman K : Culturing chick muscle cells on glycosaminoglycan substrate : attachment and differentiation. Develop Biol 99 : 277, 1983
27. Longaker MT, Harrison MR, Crombleholme TM, et al : Studies in fetal wound healing. I. A factor in fetal serum that stimulates deposition of hyaluronic acid. J Pediatr Surg 24 : 789-792, 1989
28. Longaker MT, Whitby DJ, Ferguson MJW, et al : Studies in fetal wound healing. III. Early deposition of fibronectin distinguishes fetal from adult wound healing. J Pediatr Surg 24 : 799-805, 1989
29. Longaker MT, Chiu ES, Harrison MR, et al : Studies in fetal wound healing. IV. Hyaluronic acid stimulating activity distinguishes fetal from adult wound fluid. Ann Surg 210 : 667-672, 1989
30. Longaker MT, Whitby DJ, Adzick NS, et al : Studies in fetal wound healing, VI. Second and early third trimester fetal wounds demonstrate rapid collagen deposition without scar formation. J Pediatr Surg 25 : 63-69, 1990.
31. Longaker MT, Dodson TB, Kaban LB : A rabbit model for cleft lip repair. J Oral Maxillofac Surg 48 : 714-719, 1990
32. Longaker MT, Adzick NS. : The biology of fetal wound healing : A review. Plast Reconstr Surg 87 : 788-798, 1991.
33. Longaker MT, Adzick NS, Hall JL, et al : Studies in fetal wound healing : VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid. J Pediatr Surg 25 : 430- 433, 1990.
34. Longaker MT, Chiu ES, Adzick NS, et al : Studies in fetal wound healing : V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. Ann Surg 213 : 292-296, 1991
35. Mast BA, Hyynes JH, Krummel TM et al : In vivo degradation of fetal wound hyaluronic acid results in increased fibroplasia, collagen deposition, and neovascularization. Plast

- Reconstr Surg, 89 : 503-, 1992
36. Mulvihill SJ, Stone MM, Fonkalsrud EW, et al : Trophic effect of amniotic fluid on fetal gastrointestinal development. J Surg Res 40 : 291-296, 1986
 37. 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
 38. Rowsell AR : The intrauterine healing of fetal muscle wounds : experimental study in the rat. Br J Plast Surg 37 : 635-642, 1984
 39. Siebert JW : Fetal wound healing : A biochemical study of scarless healing. J Pediatr Surg 85 : 495-502, 1990
 40. Scott JE, Hughes EW : Proteoglycan-collagen relationships in developing chick and bovine tendons : Influence of the physiologic environment. Connect Tissue Res 14 : 267, 1986
 41. Somasundaram K, Prathap K : Intra-uterine healing of skin wounds in rabbit foetuses. J Pathol 100 : 81-86, 1970
 42. Stanley JR, Alvarez OM, Bere W : Detection of basement membrane zone antigens during epidermal wound healing in pigs. J Invest Dermatol 77 : 240, 1981
 43. Stern M, Schmidt B, Dodson TB, et al : Fetal cleft lip repair in rabbits : Histology and role of hyaluronic acid. J Oral Maxillofac Surg 50 : 263-268, 1992
 44. Sullivan WG : In utero cleft lip repair in the mouse without an incision. Plast Reconstr Surg 84 : 723-732, 1989
 45. Thomasson BH, Ravitch MM : Fetal surgery in the rabbit. Surgery 66 : 1092-1102, 1969
 46. Tonnesen MG, Jenkins D, Siegal SL, et al : Expression of fibronectin, laminin and factor VIII-related antigen during development of the human cutaneous microvasculature. J Invest Dermatol 85 : 564-568, 1985
 47. Toole BP : Glycosaminoglycans in morphogenesis, in Hay ED(ed) : Cell biology of the extracellular matrix. New York, NY, Plenum, 1982, p259
 48. Vogel KG, Trotter JA : The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. Collagen Re却 Res 7 : 105-, 1987
 49. Whitby DJ, Ferguson MWJ : The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. Development 112 : 651-668, 1991

- ABSTRACT -

A STUDY ON THE EXTRACELLULAR MATRIX IN THE ARTIFICIALLY CREATED CLEFT LIP WOUND HEALING OF RABBIT FETUSES.

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

Dept. of Orthodontics, College of Dentistry, Seoul National University

Adult wound healing is accompanied with inflammation and eventual scar formation, whereas fetal wounds heal rapidly by mesenchymal proliferation without significant inflammatory cell participation and with minimal or no scar formation. The cellular mechanisms underlying these differing forms of wound healing are unknown but the extracellular matrix, through its effects on cell function, may play a key role. Therefore the purpose of this study is to investigate the spatial and temporal deposition of several component of extracellular matrix, which are known to be 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 the repaired group, the unrepaired group and the sham-operated control group. At 1, 2, 3, 5, 7 days after procedure, fetuses were obtained by Caeserean section. After documenting the viability of fetuses, they were photographed to compare size and facial morphology and sectioned for histological examination by H & E stain and spatial and temporal deposition of collagen type I, III, IV, V and fibronectin, laminin by immunohistochemical method.

The findings are summarized as follows

1. There were lack of inflammation in the repaired and the unrepairs group during experimental periods.
2. The reepithelialization of the unrepairs group was slower than that of the repaired group.
3. Collagen I, III, V were found from post-op. third day. There were no difference of distribution in the control, the repaired and the unrepairs group. Collagen types I, III, V were present in all groups with restoration of the normal collagen pattern in the fetus. This implies that lack of scarring in fetal wounds is due to the difference of collagen organization pattern within wound and not simply lack of collagen formation.
4. Collagen IV was slightly increased at post-op. third day and decreased after post-op. fifth day. Eventually there were no differences in the control, the repaired and the unrepairs group. Laminin was found at post-op. fifth day and maintained staining density until post-op. seventh day. There were no differences in the control, the repaired and the unrepairs group. According to staining of laminin and collagen type IV in epithelial basement membrane, formation of epithelial basement membrane was not completed until reepithelialization was finished.
5. According to staining of laminin and collagen type IV, there were no increase of neovascularity in the repaired and the unrepairs group.
6. Fibronectin was increased until post-op. third day at fibrin clot, wound base and margin and decreased after post-op. fifth day. Eventually, there were no differences in the control, the repaired and the unrepairs group. So it implies fibronectin plays a role as provisional matrix for fetal wound healing.

KOREA. J. ORTHOD. 1998 ; 28 : 1-15

* Key words : cleft lip, fetal wound healing, collagen, fibronectin, laminin, immunohistochemistry