

## 토끼 구강점막 상피세포 성장에 미치는 환경인자의 영향

윤문영 · 박희정 · 이두훈 · 장인근 · 박정극<sup>†</sup> · 김우식\*

동국대학교 공과대학 생명·화학공학과

100-715 서울시 중구 필동 3가 26

\*연세대학교 공과대학 화학·생명공학부

120-749 서울시 서대문구 신촌동 134

(2004년 11월 4일 접수, 2005년 1월 13일 채택)

## Effect of Environmental Factors on the Growth of Rabbit Oral Keratinocytes

Moon-Young Yoon, Hee-Jung Park, Doo-Hoon Lee, In-Keun Jang, Jung-Keug Park<sup>†</sup> and Woo-Sik Kim\*

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, 26, 3-ga, Pil-dong, Chung-gu, Seoul 100-715, Korea

\*School of Chemical Engineering and Biotechnology, Yonsei University, 134, Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Korea

(Received 4 November 2004; accepted 13 January 2005)

### 요 약

토끼 구강점막 상피세포의 분리 및 일차배양 방법, 세포성장 환경인자의 영향에 대한 연구를 T75-플라스크를 사용하여 수행하였다. 토끼의 구강점막조직을 채취(biopsy)한 후 트립신(trypsin) 효소처리방법을 이용하여 0.25 cm<sup>2</sup> 점막 조직으로부터 1.92±0.59×10<sup>6</sup>개의 점막 상피세포를 회수할 수 있었다. 회수한 점막 상피세포를 50 mg/L BPE(bovine pituitary extract), 5.0 µg/L EGF(human recombinant epidermal growth factor), 0.15 mM Ca<sup>2+</sup>을 함유한 K-SFM(keratinocyte serum free medium)을 10 mL씩 사용하여 일차 배양한 결과 8일 만에 배양용기표면에 세포가 포화(confluent)하게 성장하였고 배가시간은 2.45일이었다. 일차 배양한 세포를 회수한 후 배지종류, 배지부피, 첨가물 종류가 상피세포 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 혈청첨가배지는 세포 성장에 부정적인 효과를 나타냈고, 혈청농도가 증가함에 따라 세포 성장은 큰 변화가 없었다. 배지부피가 증가함에 따라 세포 성장은 감소하였고, 칼슘농도가 증가할수록 세포 성장은 증가하였으며 2.0 mM에서 최적치를 나타내었다. 이상으로 토끼 구강점막 상피세포를 T75-플라스크를 사용하여 배양하는 경우 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 2.0 mM Ca<sup>2+</sup>을 함유한 K-SFM을 10 mL씩 사용하는 조건이 가장 적합하였고 배가시간은 1.32일이었다. 이러한 연구결과는 향후 점막뿐만 아니라 피부, 각막 등 인체에 존재하는 상피세포배양을 위한 공정개발이나 생물반응기 설계에 유용한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

**Abstract** - Isolation and primary culture technique of rabbit oral keratinocytes, and the study for effect of environmental factors on the cell growth were carried out in T75-flask. 1.92±0.59×10<sup>6</sup> viable cells were isolated by trypsin enzymatic digestion method from 0.25 cm<sup>2</sup> biopsy of rabbit oral mucosa. Primary culture with 10 mL of K-SFM containing 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF and 0.15 mM Ca<sup>2+</sup> showed confluence after 8 days and doubling time was 2.54 days. Effect of medium types, medium volume and supplement types on the cell growth was investigated after the cultured keratinocytes had been harvested from primary confluence. Serum addition showed adverse effect and the increase of serum concentration didn't have an effect on the cell growth. The increase of medium volume decreased the cell growth. The increase of calcium concentration increased the cell growth and 2.0 mM was optimum value. In conclusion, when rabbit oral keratinocytes was cultured in T75-flask, the most effective conditions was to use 10 mL of K-SFM containing 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF and 2.0 mM Ca<sup>2+</sup>, and doubling time was 1.32 days. This study can provide the useful informations to develop a process and design a bioreactor for the culture of keratinocytes in human body like skin and cornea, as well as mucosa.

Key words: Keratinocyte, Mucosa, Medium Supplements, Calcium, Environmental Factors, Serum-free Medium

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jkpark@dongguk.edu

\*이 논문은 연세대학교 김우식 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

## 1. 서 론

구강악안면외과 분야에서 구강 내 악성종양을 제거하는 경우 광범위한 구강점막손상이 야기되면 이러한 경우 피부를 이식하는 것이 일반적인 치료방법이다[1, 2]. 그러나 이러한 피부조직을 이식할 경우 피부 본래의 구조와 기능을 유지하기 때문에 점막조직과 본질적으로 매우 다르고 진피세포와 연결세포와의 상호작용 때문에 피부 자체의 특징이 그대로 유지된다[3]. 그러므로 이렇게 이식된 피부조직은 털이 자라거나 땀이 날 수도 있기 때문에 환자에게는 부적합할 수 있으므로 점막 손상을 치료하기 위해서는 점막 조직을 이식하는 것이 이상적이라 할 수 있다[4, 5]. 점막조직은 환자 자신의 것을 사용하는 것이 면역 거부반응을 발생시키지 않기 때문에 가장 이상적이지만, 자기 신체 내에서 광범위한 점막조직을 떼어내는 것은 거의 불가능하므로 이에 대한 대안으로 본인의 구강에서 소량의 점막조직을 떼어낸 후 점막세포를 분리하여 체외에서 성장시켜 3차원적인 인공점막조직을 제조하는 조직공학 기술을 사용하는 것이 가장 바람직한 방법이라 할 수 있다[6-9]. 또한, 구강점막 상피세포는 피부 상피세포보다 성장속도가 빠르고 체외에서 생존기간이 길고 조직채취(biopsy) 후에 흉터를 숨길 수 있으므로 피부 치료를 위한 인공상피조직 세포원으로서 잠재성이 높다[10]. 이러한 인공점막조직을 제조하기 위해서는 체외에서 점막 상피세포를 대량 증식시킬 수 있는 배양환경 탐색에 대한 연구가 선행되어야 하는데 아직 이러한 연구는 미비한 상태이다. 상피세포를 배양하기 위하여 3T3 섬유모세포를 feeder layer로 사용하는 것이 일반적인데[11], 이 방법은 체외에서 악성 종양, 잠재적인 세포독성물질 및 다른 유사한 문제점들을 연구하는 경우에 여러 가지 혼동되는 인자들을 발생시킬 수 있어서 이러한 feeder layer의 사용을 피하기 위한 여러 가지 다른 상피세포 배양방법들이 개발되어 왔다. 즉, 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin) 같은 세포외 기질(extracellular matrix)에서 발견된 분자들을 배양표면에 코팅하는 방법[12], 배양용 배지의 칼슘농도를 변화시키는 방법[13], conditioned medium 이나 complex biologic extracts를 사용하는 방법[14], 상기의 몇 가지 방법들을 혼합하여 사용하는 방법[15] 등이 있으나 이러한 방법들은 단지 생물학적인 측면에서 세포의 기능을 보기 위한 배양방법이라 할 수 있고 세포를 회수한 후 사용하기 위한 목적으로는 이러한 방법들이 비경제적 이거나 매우 불편한 방법들이다. 본 연구에서는 T75-플라스크에서 토끼 구강점막 상피세포를 신속히 성장시키기 위하여, 상피세포 분리 및 일차배양과 환경인자에 대한 영향을 조사한 후 분석하였다. 환경조건을 탐색하기 위하여 배지종류, 배지 첨가물과 배지부피에 대한 영향을 조사하였고, 배지 첨가물은 기본적으로 사용되는 혈청, BPE와 EGF, 칼슘만으로 조건들을 제한하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2-1. 토끼 구강점막 상피세포 분리 및 일차배양

토끼 구강점막 상피세포를 분리하는 절차에 대하여 Fig. 1에 묘사하였다. 토끼는 뉴질랜드산 흰색 집토끼로 11주된 평균 2.5 kg 무게의 수컷을 사용하였고, 토끼의 구강 점막조직을 요오드액(상품명: 그린 포비돈, 그린제약(주))으로 충분히 닦아주고 항생제(Antibiotic Antimycotic, Invitrogen, Cat.# 600-5240AG)가 20 µl/mL로 포함된 DMEM(Invitrogen Cat.# 12800-017)에 넣어 냉장온도로 운반하였다.

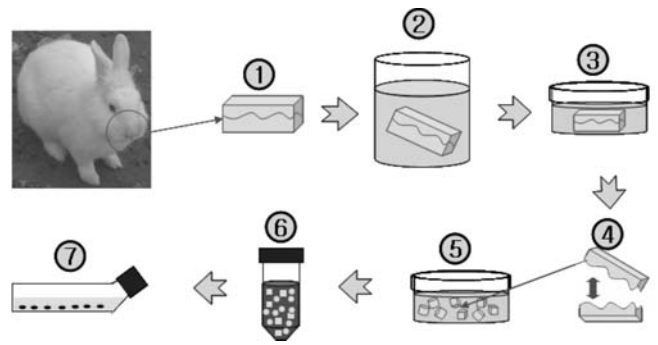


Fig. 1. Schematic diagram of procedures to isolate oral keratinocytes from normal rabbit mucosal segment. ① Mucosal segment, ② Washing with 70% ethanol and PBS, ③ Incubation for 16 hours at 4 °C in dispase solution, ④ Separation of epidermis and dermis, ⑤ Chopping and trypsinization, ⑥ Isolation of epithelial cells, ⑦ Culture in T75-flask.

구강 점막조직을 70% 에탄올로 세척하고 다시 Antibiotic Antimycotic 200 µl와 Gentamycin(Invitrogen, Cat.# 600-5710 AD, 0.1 µl/mL) 10 µl가 들어있는 10 mL PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 후 안과 수술용 가위로 진피와 피하지방층 부위를 충분히 제거하고, 2.4 U/mL의 활성을 가진 protease(dispase; Sigma Cat.# P-3417) 용액에 넣고 4 °C에서 16시간 처리한 후 포셉(forceps)을 이용하여 상피층과 진피층을 분리하였다. 상피층을 안과용 수술 가위를 이용하여 미세하게 자른 후 0.05% 트립신(trypsin, Sigma Cat.# T-4799)과 0.01% EDTA를 함유한 PBS 용액에 넣고 37 °C에서 10분간 처리하였고 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum, Invitrogen Cat.# 12484-028)가 함유된 DMEM 배지에 옮겨 1,000 rpm에서 5분 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 다시 K-SFM(keratinocyte serum free medium, Invitrogen, Cat.# 320-7005PJ) 기본배지 10 mL를 첨가한 후 피펫팅(pipetting)을 약 5분 실시하여 세포를 분리하였다. 생세포 계수(viable cell count)는 PBS에 녹인 4.0 g/L의 트립판 블루(trypsin blue, Sigma Cat.# T-5526) 용액으로 염색한 후 hemocytometer를 이용하여 수행하였다. 회수한 세포는  $Ca^{2+}$ 농도 0.15 mM, antibiotic antimycotic 항생제의 농도를 10 µl/mL, 배지 첨가물(supplement)로 BPE(bovine pituitary extract, Invitrogen Cat.# 13028-014) 50 mg/L와 EGF(human recombinant epidermal growth factor, Invitrogen Cat.# 10450-013) 5.0 µg/L이 함유된 K-SFM을 사용하여 배양하였고, 배지 10 mL을 함유한 T75-플라스크(표면적 75 cm<sup>2</sup>)에 접종하여 2일마다 배지를 교환해 주면서 37 °C로 유지되는 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다.

### 2-2. 배지 종류, 첨가물 종류, 칼슘농도 및 배지부피의 영향

토끼 구강점막 상피세포를 성장시키는데 배지종류의 영향을 조사하기 위하여 ① K-SFM 기본배지에 BPE 50 mg/L, EGF 5.0 µg/L, 1.5 mM  $Ca^{2+}$ 를 첨가한 경우, ② MEM 배지에 FBS 10%(v/v) 첨가한 경우, ③ DMEM 배지에 FBS 10%를 첨가한 경우, ④ Ham's F-12 배지에 FBS 10% 첨가한 경우를 비교하여 보았다. 배지첨가물의 종류에 대한 영향을 조사하기 위하여 ① K-SFM 기본배지에서 배양한 경우, ② K-SFM 기본배지에 첨가물로 1.5 mM  $Ca^{2+}$ 과 FBS 10%를 첨가한 경우, ③ K-SFM 기본배지에 첨가물로 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM  $Ca^{2+}$ 를 첨가한 경우, ④ K-SFM 기본배지에 첨가물

로 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 과 FBS 10%를 첨가한 경우를 비교하여 보았다. 혈청첨가의 영향을 조사하기 위하여 K-SFM 기본배지에 BPE, EGF,  $\text{Ca}^{2+}$ 을 넣지 않고 FBS 0, 5, 10, 15, 20% 농도로 첨가 배양하여 토끼 구강점막 상피세포 성장을 비교하였다. 칼슘농도의 영향을 조사하기 위하여 50 mg/L BPE와 5.0 µg/L EGF를 함유한 K-SFM 배지에  $\text{Ca}^{2+}$ 농도를 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mM이 되도록 조절한 후 세포성장을 비교하였다. 상기의 모든 실험에서 배지부피는 10 mL로 하였다. 배지부피에 대한 영향은 T75-플라스크에 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  함유한 K-SFM 배지를 각각 10, 15, 20 mL 되도록 조절하여 배양한 후 세포성장을 비교하였다. 모든 경우 배양조건은 일차배양 후 회수한 세포를  $\text{cm}^2$ 당  $3.5 \times 10^3$ 개 농도로 각각의 배지를 함유하고 있는 T75-플라스크에 접종하여 37 °C로 유지되는  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 4일 배양한 후 hemocytometer를 이용하여 생세포 계수(viable cell count)를 수행하였고, 배지교체 주기는 2일로 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 토끼 구강점막 상피세포 분리 및 일차 배양

토끼로부터 구강점막조직을 떼어낸 후 점막 상피층만을 분리하여 트립신으로 효소처리 한 후 연속적인 피펫팅(pipetting)으로  $0.25 \text{ cm}^2$ 의 점막 조직으로부터  $1.92 \pm 0.59 \times 10^6$ 개의 점막 상피세포를 회수할 수 있었다. 회수된 세포를 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 0.15 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 을 함유한 K-SFM을 사용하여 10 mL씩 2일마다 배지를 교환해주면서 배양한 결과 8일 만에 배양표면에 포화(confluent)되게 성장하였다. Fig. 2는 일차 배양과정에서 배양시간에 따라 세포성장을 보기 위하여 광학현미경하에서 찍은 사진을 나타낸 것이다. 배양 초기에는 성장이 빠르게 이루어지지 않았지만, 배양 4일 후부터는 빠른 속도로 성장하였다. 배양완료 후 총 세포수를 측정한 결과 초기 접종량이  $2.6 \times 10^5$ 개의 세포수로부터 배양 8일 동안  $(2.5 \pm 0.3) \times 10^6$ 개의 세포수로 증식하여 초기에 비해 약 9.6배의 성장을 나타내었

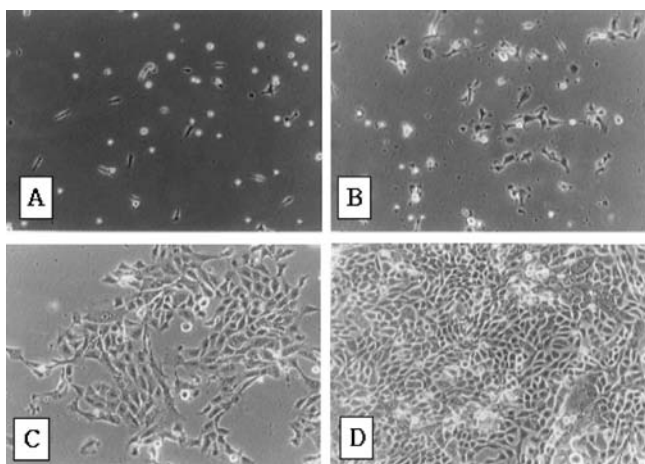


Fig. 2. Light microscopic pictures for the primary culture of normal rabbit oral keratinocytes at Day 1 (A), Day 2 (B), Day 4 (C) and Day 8 (D). After the keratinocyte was isolated from mucosal segment,  $3.5 \times 10^3/\text{cm}^2$  of cells were inoculated into T75-flask with 10 mL of K-SFM containing 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF and 0.15 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Photographs at a magnification of  $\times 100$  were taken with a camera attached to a phase-contrast microscope. Bar indicates 200 µm.

고, 배가시간(doubling time)은 2.45일이었다. Daniels 등[16]의 보고에 의하면 영국에서 현재 사용하고 있는 상피세포 배양방법에 대한 조사에서 3T3 섬유모세포를 feeder layer로 사용하여 혈청이 함유된 고농도 칼슘 배지를 사용하는 방법이 53%로 나타났고, 저농도 칼슘의 무혈청 배지를 사용하는 방법이 43%로 나타났다. 혈청을 함유한 배지를 사용하는 경우는 혈청내의 오염원으로 인한 허가문제 등의 여러 복잡한 문제를 발생시킬 수 있으므로 현재 무혈청 배지를 사용하려는 방향으로 전환하고 있다. 저농도 칼슘을 함유한 무혈청 배지의 단점은 feeder layer를 사용하는 경우보다 세포 배양에 실패하는 경우가 많고 세포의 성장속도가 느려서 일차 배양기간이 2주 정도 걸린다는 것이다. 그러나 본 연구에서는 일차 배양기간이 8일로 나타났는데 이 결과는 배지종류, 첨가물 종류, 칼슘농도 외에도 배양용기의 표면적 증가와 배지부피 감소와 같은 환경인자에 의한 영향으로 사료되고, 이런 인자들이 세포의 autocrine 메커니즘에 의한 사이토카인의 농도를 증가시켜서 세포성장을 더욱 촉진시켰기 때문으로 사료된다. 이런 환경인자들의 영향에 대해 좀 더 구체적으로 조사하기 위하여 일차 배양한 세포를 회수하여 환경인자의 영향에 대한 추가적인 실험을 계속 진행하였다.

#### 3-2. 배지 종류, 첨가물 종류, 혈청, 칼슘농도 및 배지부피의 영향

토끼의 구강점막 상피세포를 성장시키는데 무혈청의 기본배지인 K-SFM에 첨가물로 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 을 함유한 배지와 혈청이 함유된 몇 가지 배지 종류의 영향을 조사하였다. Fig. 3에서 나타난 것처럼 K-SFM에 첨가물을 함유한 경우가 MEM, DMEM, F-12 배지에 혈청을 첨가한 경우보다 37.5%, 106.3%, 112.9%로 세포성장이 증가하였다.

이 결과로부터 K-SFM 기본배지에 BPE, EGF, 칼슘 그리고 혈청 첨가가 세포 성장에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 하였다. K-SFM 기본배지에서 배양한 경우에 비해 K-SFM 기본배지에 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가한 경우가

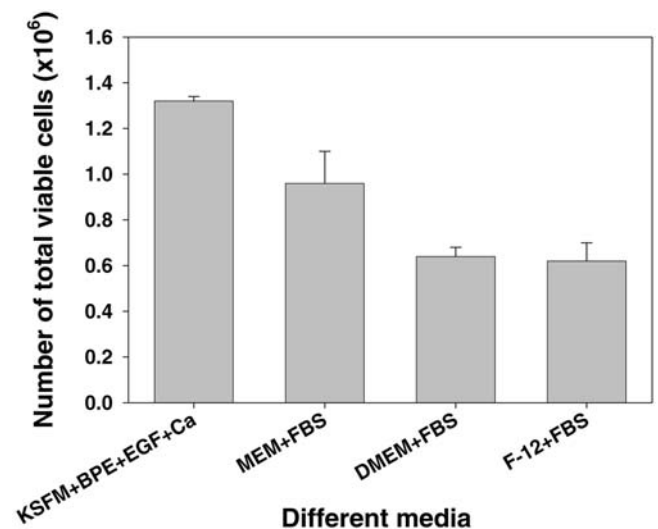
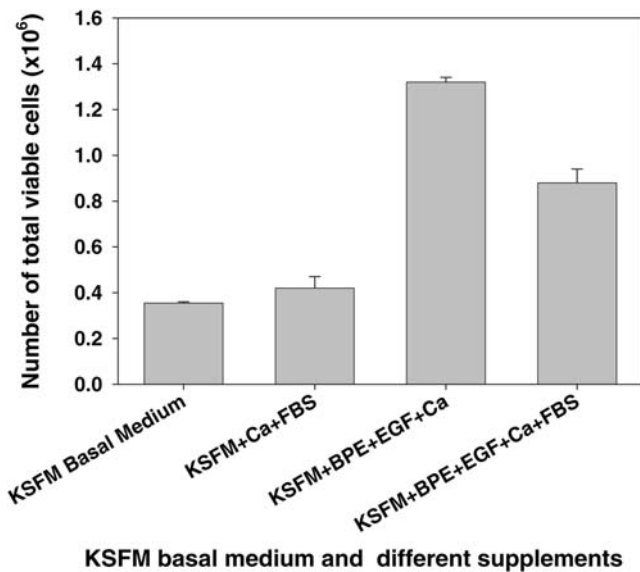
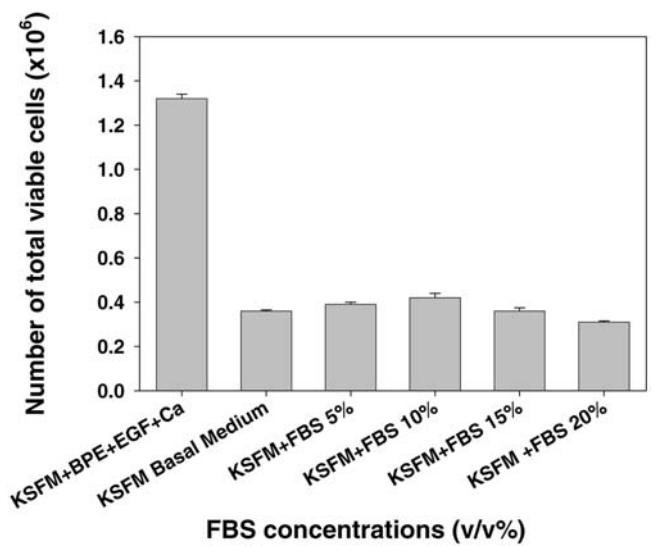


Fig. 3. Effect of media types on the growth of rabbit oral keratinocytes. After the cultured keratinocyte had been harvested from primary confluence,  $3.5 \times 10^3/\text{cm}^2$  of cells were inoculated into T75-flask with 10 mL of each media. Supplements were used at the concentrations of 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 10% (v/v) FBS. Cell number was counted after 4 days of culture.



**Fig. 4. Effect of supplements on the growth of rabbit oral keratinocytes.** After the cultured keratinocyte had been harvested from primary confluence,  $3.5 \times 10^3/\text{cm}^2$  of cells were inoculated into T75-flask with 10 mL of K-SFM containing different supplements. Supplements was used at the concentration of 50 mg/L BPE, 5.0  $\mu\text{g/L}$  EGF, 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 10% (v/v) FBS. Cell number was counted after 4 days of culture.



**Fig. 5. Effect of serum concentrations on the growth of normal rabbit oral keratinocytes.** After the cultured keratinocyte had been harvested from primary confluence,  $3.5 \times 10^3/\text{cm}^2$  of cells were inoculated into T75-flask with 10 mL of K-SFM containing different serum concentrations. Supplements was used at the concentration of 50 mg/L BPE, 5.0  $\mu\text{g/L}$  EGF and 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Cell number was counted after 4 days of culture.

271.8% 세포성장이 증가 하였고, 50 mg/L BPE, 5.0  $\mu\text{g/L}$  EGF, 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가한 K-SFM에 혈청을 더 첨가한 경우는 세포성장이 오히려 33.3% 감소하였다. K-SFM 기본배지에 첨가물로 BPE와 EGF를 제외하고 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 과 10%(v/v) 혈청만을 첨가한 경우는 BPE, EGF, 칼슘을 함유한 배지에 비해 세포성장이 68.2% 감소하였다. 이 결과로부터 BPE, EGF, 칼슘이 세포 성장에 깊이 관여하는 것으로 판단되고 혈청첨가는 부정적인 효과를 나타내는 것으로 사료된다. Wang 등[17]은 BPE는 혈청처럼 단백질과 성장인자들의 복합체이고, 상피세포 성장을 촉진하는 역할을 하지만 진피세포인 섬유모세포의 성장을 촉진하지는 않고, 상피세포의 분화를 저해하는 것으로 보고하였으나 아직 이것에 대한 정확한 작용 메커니즘은 밝혀지지 않고 있다. 또한, BPE의 아미노산 조성은 bovine pancreatic trypsin inhibitor(bPTI)처럼 트립신 처리에 의해 상피세포를 회수한 후 남아 있는 트립신의 활성을 저해할 수 있고 BPE에는 EGF 성분이 함유되어 있지 않은 것으로 보고하였다. Kamata 등[18]은 BPE가 첨가되지 않은 무혈청 배지의 경우 상피세포가 성장하지 않았고, BPE를 함유하지 않는 무혈청 배지에서 EGF, KGF, IGF-I과 bFGF 같은 성장인자들의 첨가가 상피세포의 성장을 크게 자극한다고 보고하였다. 그러나 Cook 등[19]은 사람의 foreskin 상피세포의 경우 세포농도가  $\text{cm}^2$ 당  $5 \times 10^3$ 개 이상일 때 peptide growth factor가 없어도 상피세포가 연속적으로 성장하였고, IGF, EGF, TGF- $\alpha$ , FGF를 추가로 첨가한 경우 성장속도를 크게 바꾸지 않았다고 보고하였다. 이런 다른 결과는 상피세포가 성장할 때 autocrine 메커니즘에 의한 영향 때문이라 할 수 있고, 특히 EGF-R(EGF-receptor)와 그것의 리간드(ligands)가 autocrine[20, 21]과 paracrine 성장조절[22-24]에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 무혈청 배지를 사용하는 경우 진피세포가 분비하는 사이토카인 역할을 하는 EGF를 포함하는 몇몇 성장인자들과 BPE 같은 단백질들을 첨가해 주어야 하는 것이 일반

적이지만 본 연구에서는 이런 상피세포의 autocrine 메커니즘을 고려하여 기본적인 첨가물로 사용되는 BPE, EGF, 칼슘만을 대상으로 하였다.

상기의 실험에서 혈청첨가가 세포성장에 부정적인 영향을 나타내었는데, 혈청농도에 변화를 주었을 때도 세포성장을 저해하는지를 알아보기 위하여 혈청농도에 변화를 주면서 세포성장을 조사하여 보았다. Fig. 5에 나타난 것처럼 혈청농도가 증가함에 따라 세포성장은 큰 변화를 나타내지 않았고 50 mg/L BPE, 5.0  $\mu\text{g/L}$  EGF, 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 을 함유한 K-SFM에 비해 68.2% 감소하였다. 그러므로 혈청첨가 만으로는 상피세포 성장을 원만히 유지하기가 어려운 것으로 판단된다. 일반적으로 진피세포의 경우에는 배지에 혈청을 첨가하여 배양하여야 하지만 상피세포의 경우는 혈청이 오히려 성장을 저해하였다. 이런 결과는 인체조직의 구조상 진피세포의 경우 혈관이 들어와 있지만 상피세포까지 혈관이 존재하지 않고 진피세포가 성장하면서 분비한 사이토카인에 의해 상피세포가 성장촉진을 일으키기 때문에 혈청은 상피세포에 부정적인 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 이러한 이유로 상피세포를 배양할 때 혈청을 함유한 배지에서 진피세포역할을 하는 3T3 섬유모세포를 이용하여 feeder layer를 만든 후 그 위에 상피세포를 배양하는 기술을 사용하는데[11], 이 방법은 성장이 억제된 3T3 세포를 항상 준비하는 것이 용이하지 않고, 3T3 세포의 생존도(viability)가 feeder로서 적당하지 않을 수도 있으며, 혈청 성분들이 섬유모세포를 과도하게 성장시킬 수 있을 뿐만 아니라, 혈청 단백질이 불안정한 성질을 나타내기 때문에 상피세포의 성장 동안에 문제를 발생시킬 수도 있다. 혈청은 일반적으로 동물세포배양에서 성장을 지원하는 역할을 하는데, 호르몬, 성장인자, 결합단백질(binding proteins)같은 많은 성분들을 제공하지만 박테리아, 마이코플라스마(mycoplasma), 바이러스 오염 같은 잠재적인 위험요인을 제공할 수 있다. 혈청은 또한 매 회분(batch)별로 변화가 심하고, 인체조직을 배양할 때 사용하는 경우는 면역

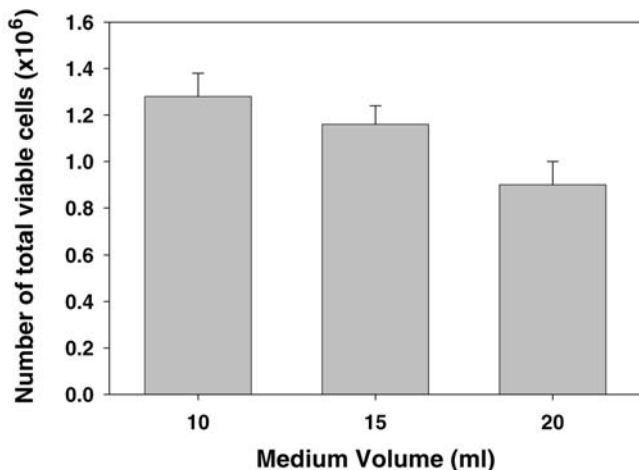


Fig. 6. Effect of medium volume on the growth of normal rabbit oral keratinocytes. After the cultured keratinocyte had been harvested from primary confluence,  $3.5 \times 10^3/\text{cm}^2$  of cells were inoculated into T75-flask with K-SFM containing 50 mg/L BPE, 5.0  $\mu\text{g/L}$  EGF, 1.5mM  $\text{Ca}^{2+}$  of different medium volume. Cell number was counted after 4 days of culture.

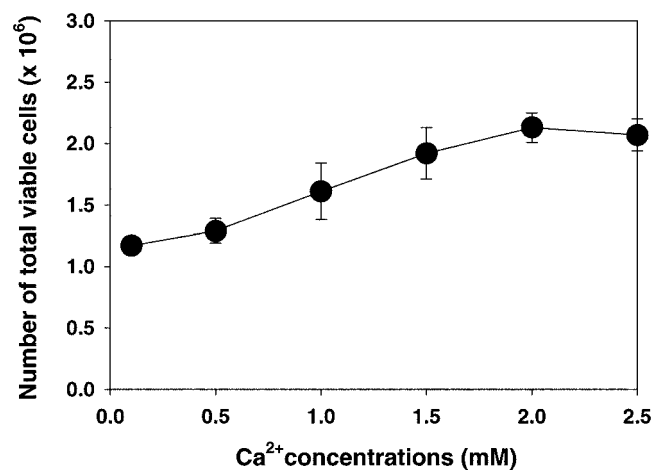


Fig. 7. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations on the growth of normal rabbit oral keratinocytes. After the cultured keratinocyte had been harvested from primary confluence,  $3.5 \times 10^3/\text{cm}^2$  of cells were inoculated into T75-flask with 10 mL of K-SFM containing 50 mg/L BPE, 5.0  $\mu\text{g/L}$  EGF and different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. Cell number was counted after 4 days of culture.

거부반응 등을 나타낼 수 있는 단점이 있다. 이러한 이유 때문에 현재 세포배양을 위하여 무혈청 배지를 이용하려는 방향으로 전환하고 있다.

Fig. 6은 동일한 배양표면적 조건에서 배지부피가 상피세포 성장에 미치는 영향을 나타낸 그래프인데, 배지부피가 10 mL, 15 mL, 20 mL 씩 증가함에 따라 상피세포 성장이 감소하는 결과를 나타내었다. 이것은 배지부피가 증가함에 따라 세포가 분비하는 사이토카인의 농도를 감소시키기 때문으로 사료된다. 그러므로 상피세포를 신속하게 증식시키는 위해서는 배지부피를 줄여서 사용하는 것이 세포 성장속도를 증가시키는데 유리할 것으로 판단된다.

상피세포 성장에 미치는 칼슘농도의 영향을 조사하여 Fig. 7에 나

타내었다. 칼슘농도가 증가할수록 세포 성장이 증가하였으며 2.0 mM 농도에서 최적치를 나타내었다. Fig. 8은 각각의 칼슘 농도에서 연속적인 계대배양을 하면서 passage number 2에서의 현미경 사진을 나타낸 것인데 세포모양은 칼슘농도가 증가할수록 점점 불균일하게 변화하는 현상을 나타내었다. 이상의 결과로 0.1 mM의 저농도 칼슘보다 2.0 mM의 고농도의 칼슘을 함유한 K-SFM에서 세포성장이 76.9% 증가하였고 배가시간은 1.32일이었다. 반면 칼슘 농도가 증가할수록 세포모양이 변하는 현상을 확인할 수 있었다. Barbara 등 [25]은 저농도 칼슘을 함유한 무혈청 배지에서 상피세포가 성장한 경우 세포 경계면이 날카롭고 매우 굴절을 보이는데 이것은 세포와 세포간의 부착능력의 결핍 때문으로 설명하였고, 칼슘농도가 증가

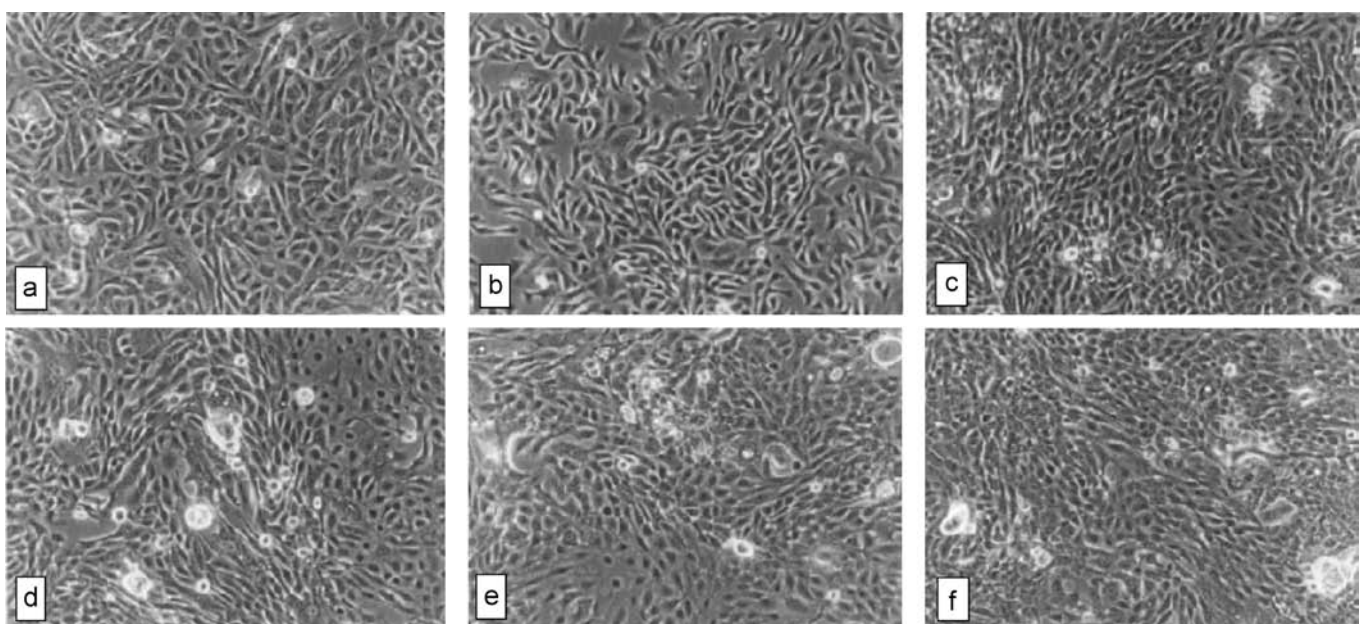


Fig. 8. Morphology of normal rabbit oral keratinocytes at passage number 2 cultured in T75-flask with 10 mL of K-SFM containing 50 mg/L BPE, 5  $\mu\text{g/L}$  EGF and 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ (a), 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ (b), 1.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ (c), 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ (d), 2.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ (e), and 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ (f). Photographs at a magnification of  $\times 100$  were taken with a camera attached to a phase-contrast microscope at Day 4 after inoculation. Bar indicates 200  $\mu\text{m}$ .

할수록 세포와 세포간의 연결이 조밀해지는 모양을 나타내었는데 이것은 칼슘농도가 카드헤린(cadherin)을 포함하는 세포내 부착 분자(intracellular adhesion molecules)의 기능을 활성화하기 때문으로 보고하였다. 고농도 칼슘에서의 세포와 세포간 연결은 P-카드헤린과 E-카드헤린의 축적에 의한 것으로 입증되었고[26], 이런 카드헤린의 활성화는 세포와 세포간의 연결뿐만 아니라 세포의 중층화(stratification)에도 관여하는 것으로 알려져 있다[27]. 이러한 세포모양을 형성하는 것은 세포가 분화하면서 조직과 같은 구조를 만들기 위한 단계로 사료된다. Fig. 8에 나타난 현미경사진에서 칼슘 농도별로 세포 모양을 비교하여 보면 이러한 보고와 유사한 것을 알 수 있다. 또한, 칼슘농도가 세포성장에 미치는 영향에 대해서는 Tsao 등[14]은 칼슘농도를 1.0 mM 함유하고 있는 배지에서 상피세포를 배양한 경우 세포성장이 현저히 감소하는 것으로 보고하였다. Kamata 등[18]도 직접 조제해 만든 무 단백질 합성배지(protein-free synthetic medium)에서 1.27 mM로 칼슘농도를 조절한 후 사람의 구강점막 상피세포를 배양한 결과 성장이 전혀 이루어지지 않았고 모두 완전히 분화되었다고 보고하였다. 그러나 Boyce와 Ham[28]의 보고에 의하면 칼슘농도가 증가할수록 상피세포의 성장이 증가하였고 0.3 mM에서 최적치를 나타내었지만 1.0 mM의 고농도 칼슘에서도 BPE를 함유한 무혈청 배지의 경우가 BPE를 함유하지 않은 경우보다 세포성장이 900% 이상 높게 나타났다. 특히 1.0 mM의 고농도 칼슘에서도 세포분화를 나타내는 인자인 cornified envelopes를 나타내는 세포가 BPE를 함유하지 않은 배지의 경우 20%를 보인 반면 BPE를 함유한 배지의 경우는 2% 정도를 나타내었다. 이 결과는 무혈청 배지에서 상피세포를 성장시키는 경우 BPE가 존재하면 고농도 칼슘에서도 세포성장이 촉진될 수 있다는 것을 입증하는 자료로 사료된다. 이렇게 칼슘농도는 상피세포를 배양할 때 성장과 분화 사이에 균형을 유지시키는 역할을 하므로 무혈청 배지에서 상피세포를 성장시키는 경우 적당한 양의 칼슘농도를 탐색하는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서도 Boyce와 Ham의 보고와 마찬가지로 칼슘농도가 증가할수록 상피세포 성장이 증가하는 결과를 보였고 2.0 mM의 고농도 칼슘에서 최적치를 나타내었는데, 이것은 BPE에 의한 영향도 있지만 배지 단위부피당 세포농도의 증가에 의하여 autocrine 기능에 의해 분비된 사이토카인의 농도도 증가하여 세포성장을 더욱 촉진시켰기 때문으로 사료된다. 즉, 배지 단위부피당 세포농도가 증가함에 따라 BPE, EGF, 칼슘, 사이토카인과 같은 성장인자들의 농도도 상응하여 증가하여야 세포 성장이 더욱 촉진되는 것으로 사료된다.

#### 4. 결 론

토끼의 구강점막조직으로부터 디스파제(dispase) 효소와 트립신(trypsin) 효소분해방법을 이용하여 점막상피세포를 분리한 결과 0.25 cm<sup>2</sup> 점막조직으로부터 1.92±0.59×10<sup>6</sup>개의 생세포(viable cell)를 회수할 수 있었다. 회수한 점막 상피세포를 2.6×10<sup>5</sup>개 접종하여 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 0.15 mM Ca<sup>2+</sup>의 K-SFM을 10 mL 함유한 T75-플라스크에서 일차 배양한 결과 8일 만에 배양용기에 세포가 포화(confluent)되게 성장하였고, 총세포수는 2.5±0.3×10<sup>6</sup>개로 9.6배 성장하였으며 배가시간은 2.45일이었다. 일차 배양한 세포를 회수한 후 T75-플라스크를 사용하여 무혈청배지와 혈청첨가배지에 대한 영향을 조사한 결과 K-SFM에 첨가물로 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L

EGF, 1.5 mM Ca<sup>2+</sup>을 함유한 무혈청 배지가 MEM, DMEM, F-12 배지에 혈청을 첨가한 경우보다 각각 37.5%, 106.3%, 112.9%까지 세포성장이 증가하였다. 배지 첨가물에 대한 영향을 조사하여 본 결과 K-SFM 기본배지에서 배양한 경우에 비해 K-SFM 기본배지에 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM Ca<sup>2+</sup>을 첨가한 경우가 271.8% 세포성장이 증가하였고, 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM Ca<sup>2+</sup>을 첨가한 K-SFM에 10%(v/v) 혈청을 더 첨가한 경우는 세포성장이 오히려 33.3% 감소하였다. K-SFM 기본배지에 첨가물로 BPE와 EGF를 제외하고 1.5 mM Ca<sup>2+</sup>과 10%(v/v) 혈청만을 첨가한 경우는 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 1.5 mM Ca<sup>2+</sup>을 함유한 K-SFM에 비해 세포성장이 68.2% 감소하였다. 또한, 혈청농도가 증가함에 따라 세포성장은 큰 변화를 나타내지 않아서 혈청첨가는 상피세포 성장에 부정적인 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 동일한 배양표면적에서 배지부피가 증가함에 따라 세포성장은 감소하였고 배지부피를 10 mL 씩 사용한 경우에 비해 15 mL 사용한 경우 9%, 20 mL씩 사용한 경우 30%까지 상피세포 성장이 감소하였다. 이것은 배지부피가 증가할수록 세포에서 분비되는 사이토카인의 농도가 감소하였기 때문으로 사료된다. 칼슘농도가 증가할수록 세포성장은 증가하였으며 2.0 mM 농도에서 최대치를 나타내었다. 0.1 mM의 저농도 칼슘보다 2.0 mM의 고농도의 칼슘을 함유한 K-SFM에서 세포성장이 76.9% 증가하였다. 이상으로 토끼 구강점막 상피세포를 T75-플라스크를 이용하여 배양하는 경우 50 mg/L BPE, 5.0 µg/L EGF, 2.0 mM Ca<sup>2+</sup>을 함유한 K-SFM을 10 mL씩 사용하는 환경조건이 가장 적합하였고, 배가시간은 1.32일이었다. 이러한 연구결과는 향후 점막뿐만 아니라 피부, 각막 등 인체에 존재하는 상피세포 배양을 위한 공정개발이나 생물반응기 설계에 유용한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

#### 감 사

본 연구는 보건복지부 의료공학 융합기술 개발사업(과제번호 00-PJ1-PG1-CH12-0006) 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Teichgraaber, J., Larson, D. and Castaneda, O., "Skin Grafts in Intraoral Reconstruction," *Arch. Otolaryngol.*, **110**, 528-532(1984).
2. Schramm, V. L. and Myers, E. N., "Skin grafts in Oral Cavity Reconstruction," *Arch. Otolaryngol.*, **106**, 528-532(1980).
3. Ueda, M., Ebata, K. and Kaneda, T., "In Vitro Fabrication of Bio-artificial Mucosa for Reconstruction of oral Mucosa: Basic Research and Clinical Application," *Ann. Plast. Surg.*, **27**(6), 540-549(1991).
4. Chase, D. C., Gattozzi, J. G. and Smith, K., "Palatal Graft in Pre-prosthetic Surgery," *Oral. Surg.*, **45**, 516-527(1978).
5. Fry, T. L. and Woods, C. I., "Readily Available Full-Thickness Mucous Membrane Grafts," *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **113**, 770-771(1987).
6. Hata, K., Kagami, H., Ueda, M., Torii, S. and Matsuyama M., "The Characteristics of Cultured Mucosal Cell Sheet as a Material for Grafting: Comparison with Cultured Epidermal Cell Sheet," *Ann. Plast. Surg.*, **34**, 530-538(1995).
7. Izumi, K., Feinberg, S. E., Iida, A. and Yoshizawa, M., "Intraoral Grafting of an ex vivo Produced Oral Mucosa Equivalent: a Pre-

- liminary Report," *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **32**, 188-197(2003).
8. Moriyama, T., Asahina, I., Ishii, M., Oda, M., Ishii, Y. and Enomoto, S., "Development of Composite Cultured Oral Mucosa Utilizing Collagen Sponge Matrix and Contracted Collagen Gel: a Preliminary Study for Clinical Applications," *Tissue Engineering*, **7**(4), 415-427(2001).
9. Fujiyama, C., Masaki, J. and Sugihara, H., "Reconstruction of the Urinary Bladder Mucosa in Three Dimensional Collagen Gel Culture: Fibroblast-Extracellular Matrix Interactions on the Differentiation of Transitional Epithelial Cells," *J. Urol.*, **153**, 2060-2067(1995).
10. Ueda, M., Hata, K., Horie, K. and Torii, S., "The Potential of Oral Mucosal Cells for Cultured Epithelium: a Preliminary Report," *Ann. Plast. Surg.*, **35**(5), 498-504(1995).
11. Rheinwald, J. C. and Green, H., "Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: Formation of Keratinocyte Colonies From Single Cells," *Cell*, **6**, 331-343(1975).
12. Liu, S. C. and Karasek, M., "Isolation and Growth of Adult Human Epidermal Keratinocytes in Cell Culture," *J. Invest. Dermatol.*, **71**, 157-162(1978).
13. Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. and Yuspa, S. H., "Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Mouse Epidermal Cells in Culture," *Cell*, **19**, 245-254(1980).
14. Tsao, M. C., Walthall, B. J. and Ham, R. G., "Clonal Growth of Normal Epidermal Keratinocytes in Defined Medium," *J. Cell. Physiol.*, **110**, 219-229(1982).
15. Hawley-Nelson, P., Sullivan, J. E., Kung, M., Hennings, H. and Yuspa, S. H., "Optimized Conditions for the Growth of Human Epidermal Cells in Culture," *J. Invest. Dermatol.*, **75**, 176-182(1980).
16. Daniels, J. T., Kearney, J. N. and Ingham, E., "Human Keratinocyte Isolation and Cell Culture: a Survey of Current Practices in the UK," *Burns*, **22**, 35-39(1996).
17. Wang, H. J., Chen, T. M., Cheng, L. F., Cheng, T. Y. and Tung, Y. M., "Human Keratinocyte Culture using Porcine Pituitary Extract in Serum-Free Medium," *Burns*, **21**(7), 503-506(1995).
18. Kamata, N., Yokoyama, K., Fujimoto, R., Ueda, U., Hayashi, E., Nakanishi, H. and Nagayama, M., "Growth of Normal Oral Keratinocytes and Squamous Cell Carcinoma Cells in a Novel Protein-Free Defined Medium," *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, **35**, 635-641(1999).
19. Cook, P. W., Pittelkow, M. R. and Shipley, G. D., "Growth Factor-Independent Proliferation of Normal Human Keratinocytes: Production of Autocrine- and Paracrine-Acting Mitogenic Factors," *J. Cell. Physiol.*, **146**, 277-289(1991).
20. Piepkorn, M., Lo, C. and Plowman, G., "Amphiregulin-Dependent Proliferation of Cultured Human Keratinocytes: Autocrine Growth, the Effects of Exogenous Recombinant Cytokine, and Apparent Requirements for Heparin-Like Glycosaminoglycans," *J. Cell Physiol.*, **159**, 114-120(1994).
21. Pittelkow, M. R., Cook, P. W., Shipley, G. D., Derynck, R. and Coffey, R. J., "Autonomous Growth of Human Keratinocytes Requires Epidermal Growth Factor Receptor Occupancy," *Cell Growth Differ.*, **4**, 513-521(1993).
22. Dulgosz, A. A., Cheng, C., Dening, M. F., Dempsey, P. J., Coffey, R. J. and Yuspa, S. H., "Keratinocytes Growth Factor Receptor Ligands Induce Transforming Growth Factor Alpha Expression and Activate the Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway in Cultured Epidermal Keratinocytes," *Cell Growth Differ.*, **5**, 1283-1292(1994).
23. Ristow, H. J., "Studies on Stimulation of DNA Synthesis with Epidermal Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor-I in Cultured Human Keratinocytes," *Growth Regul.*, **6**, 96-109(1996).
24. Vardy, D. A., Kari, C., Lazarus, G. S. and Jensen, P. J., Zilberstein, A., Plowman, G. D. and Rodeck, U., "Induction of Autocrine Epidermal Growth Factor Receptor Ligands in Human Keratinocytes by Insulin/Insulin-like Growth Factor-I," *J. Cell. Physiol.*, **163**, 257-265(1995).
25. Marsh, B. C. R., Massaro-Giordano, M., Marshall, C. M., Lavker, R. M. and Jensen, P. J., "Initiation and Characterization of Keratinocyte Cultures from Biopsies of Normal Human Conjunctiva," *Exp. Eye Res.*, **74**, 61-69(2002).
26. Wheelock, M. J. and Jensen, P. J., "Regulation of Keratinocyte Intercellular Junction Organization and Epidermal Morphogenesis by E-Cadherin," *J. Cell. Biol.*, **117**, 415-425(1992).
27. O'Keefe, E. J., Briggaman, R. A. and Herman, B., "Calcium Induced Assembly of Adherens Junctions in Keratinocytes," *J. Cell. Biol.*, **105**, 807-817(1987).
28. Boyce, S. T. and Ham, R. G., "Calcium-Regulated Differentiation of Normal Human Epidermal Keratinocytes in Chemically Defined Clonal Culture and Serum-Free Serial Culture," *J. Invest. Dermatol.*, **81**, 33s-40s(1983).