

사람 태아의 입술 발달에 대한 형태학적 및 면역조직화학적 고찰

홍수정 · 이영준 · 김연숙 · 이석근
지제근¹

강릉대학교 치과대학 구강병리학교실
¹서울대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2002년 4월 22일
게재승인 : 2002년 8월 2일

책임저자 : 이 석 근
우 210-702 강원도 강릉시 지변동 123
강릉대학교 치과대학 구강병리학교실
전화: 033-640-2228
Fax: 033-642-6410
E-mail: sklee@knusun.kangnung.ac.kr

*본 연구는 보건복지부 보건의료기술 연구
개발사업(HMP-00-CH-11-0010)의 지원
으로 이루어졌음.

Prenatal Development of Human Lip with Immunohistochemical Study

Su Jung Hong, Young Joon Lee, Yeon Sook Kim, Suk Keun Lee and Je G. Chi¹

Department of Oral Pathology, Kangnung National University College of Dentistry, Gangneung;
¹Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : This study is aimed to elucidate the developmental pattern of human fetal lip by histological and immunohistochemical examinations. **Methods :** Totally 231 normal human lip tissues obtained from autopsied fetuses were fixed with 10% buffered formalin, sectioned in cross and longitudinal directions, routinely stained for H&E and performed for immunohistochemistry with antibodies of S-100 protein, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), transglutaminase C (TGase-C), metalloproteinase (MMP)-3, MMP-10, tenascin, KL1, K8.12, E-cadherin, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP)-1, TIMP-2 and total keratin (TK). **Results :** The lip structure first appeared as an orifice of stomodeum around the 7-8th week of gestation, and a major structure of the midface was observed by the 11-12th week. As the squamous epithelium of the lip became thick and was keratinized, the vermilion border became distinguished in the 15-16th week, and the lip structure was almost completed with the presence of orbicularis oris muscle in the lingual side of vermilion border by the 17-18th week. Immunohistochemically, the vermilion border showed strong reactions for tenascin, E-cadherin and MMP-3 and increased positivity for PCNA, cytokeratins (TK, KL1, K8.12), and TGase-C. **Conclusions :** With the above findings we suppose that the cytodifferentiation of vermilion border epithelium plays an important role for the development of human fetal lip.

Key Words : Fetal Development-Lip-Immunohistochemistry

사람의 머리와 얼굴은 다른 동물과 비교할 때 그 발생과 성장에서 뚜렷한 차이가 있다.¹⁻⁴ 그 중 입술은 그 형태가 독특하여 조직학적인 구조, 그리고 발생 및 성장 과정이 특이하다.⁵ 사람의 입술은 여러 얼굴 근육들과 연관되어 있고, 입안 기능에도 중요한 역할을 하며 사람 소화관의 관문이자 입안과 얼굴의 경계가 되는 부분이다.^{6,7} 입술은 턱얼굴 전방부의 중앙에 위치하면서 얼굴 근육 기관의 중심축을 형성한다.⁸ 윗입술과 아랫입술의 형성은 각각 독특한 기전에 의해 진행되는데, 윗입술은 위턱 돌기의 전방부와 안쪽코돌기의 외면이 융합되어 형성되며, 아랫입술은 좌우 양쪽 아래턱돌기가 융합하여 형성된다.^{5,9} 이러한 과정이 정상적으로 진행되지 못하면 입술갈림증 같은 선천기형이 생기게 되며, 입술과 입술 주위 근육 간의 유기적인 상호 관계에 영향을 미쳐 입술과 얼굴에, 심미적 또는 기능적 부조화를 초래한다. 이러한 구조적, 기능적 중요성에도 불구하고 사람의

태생기 입술 발생에 관한 보고는 매우 드물다.^{10,11}

입술은 입안 점막과 피부 상피를 구분하면서 입둘레근(orbicularis oris)이 부착되어 있어 그 기능이 다양하다.^{12,13} 털주머니, 기름샘 그리고 땀샘을 갖고 있는 피부는 입술에서 입안 점막과 연속되어 있다.¹⁴ 이 이행부, 즉 점막 피부 경계 부위에는 주로 입구석에 위치하는 소수의 기름샘을 제외하고는 아무런 부속물이 없다. 이 부위의 상피는 각화되어 있지만 얇으며 모세혈관과 리를 가지고 있는 긴 결합조직 유두가 있다. 이러한 특수한 혈관 구조는 혈액을 표면 가까이 근접시켜서 이 부위를 진한 붉은 색으로 보이게 하므로 홍순(vermilion zone)이라 불린다. 홍순에는 소수의 기름샘만 있을 뿐 침샘이 없기 때문에 쉽게 건조해져서 추운 날씨에는 종종 갈라져 아프게 된다. 입술에 있는 입안 점막과 피부의 경계 부위인 홍순 경계(vermilion border)는 신체의 성장 발육이나 건강 상태의 지표가 된다고 일반적으로

알려져 있다. 따라서 홍순 경계의 이상은 곧 전신의 발육이나 성장, 그리고 건강 상태의 이상을 나타내는 것으로 추측할 수 있다.^{11,14-18}

홍순 부위의 조직학적 소견은 홍순과 두꺼운 비각화 입안 점막 사이에 이상각화된(parakeratinized) 구강상피로 덮여 있는 중간대가 있다. 입술 점막의 깊은 곳에는 작은 침샘과 광범위하게 존재하는 근육 조직들이 있는데 이 근육 조직들은 입둘레근의 일부이다. 사람의 입술 근육 구조는 얼굴 근육의 중심적 위치에 있으므로 특별한 중요성을 가지며 소화, 흡입, 발음 등 다양한 기능을 갖는다.¹² 입술의 구조는 학자에 따라 pars cutanea, pars glabra, pars intermedia, pars villosa, 그리고 pars mucosa의 다섯 영역으로 분류하기도 하고, 피부로 덮인 외부대(outer zone), 이행대(transitional zone: vermillion), 입안 점막으로 덮인 내부대(inner zone)의 세 영역으로 구분하기도 한다.¹⁹ 한편, 신생아의 입술은 외부 비접촉 부위(outer non contact area)와 내부 접촉 부위(inner contact area)의 두 개의 영역으로 구분하기도 한다. 내부 접촉 부위는 상피가 두꺼워지고 rete ridge (용기그물)가 넓어지며, 두꺼워진 부위의 stratum Malpighi의 외측 절반 부위에는 맑은 세포(clear cell)가 보인다. 이 세포의 핵은 중앙에 위치해 있으며, 세포내 부종이 자주 관찰된다.¹⁰ 이러한 변화는 접촉 부위에 인접한 점막과 홍순에는 관찰되지 않는다. 홍순 경계의 각화세포층은 두께가 불규칙하며, 간혹 막피복과립(membrane coating granule)이 방출되고 상부의 각질층처럼 박리되기도 하는데, 이는 각화세포의 두꺼워진 세포 외피가 새로 생기기 때문에 추측된다.²⁰ 이와 같이, 입술의 구조는 인체의 어느 부분보다 매우 특이한 구조를 갖기 때문에 발생학적으로 형성기전이 있을 것으로 많이 기대되어 왔다.

사람의 입술 조직을 얻어 실험을 하는 것은 현실적으로 어려

움이 많으나 사산된 태아에서는 입술 조직의 채취가 가능하며, 특히 태생 6개월부터는 거의 성인의 것과 비슷한 구조를 갖게 되므로 태아에서의 입술 관찰은 입술의 발달 과정을 발생학적으로 연구하는 데 적절하다고 생각된다. 특히, 입술과 홍순 경계의 발생학적 의미를 밝히고 조직학적인 특징을 밝히기 위해 면역조직화학적 연구를 수행할 필요성이 있다.^{8,21-24} 본 연구에서는 사산된 사람 태아의 입술을 재료로 하여 조직 절편을 제작하고 이에 대한 조직학적 관찰 및 면역조직화학적 염색을 통하여 사람의 태생기 입술의 형태 발달과 입술 상피의 발생을 중점적으로 관찰하였다.

재료와 방법

서울대학교 의과대학 병리학교실에서 시행된 사산 태아의 부검을 시행한 결과 선천기형이 없는 231예의 태아에서 얻은 입술 조직을 사용하였다(Table 1). 각각의 표본은 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후 통상적인 방법에 의하여 파라핀 절편을 제작하였다. 입술 조직은 좌우로 나누어서 입술의 중단면 절편과 횡단면 절편을 제작하고 HE 염색 및 periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 통하여 태령별로 입술의 조직학적인 변화를 관찰하였으며, 세포 활성도를 관찰하기 위하여 여러 종류의 항체들을 사용해서 면역조직화학 염색을 시행하였다. 사용된 항체들은 total keratin (TK, rabbit polyclonal antibody, Bio-Yeda, Rehovot, Israel)과 KL1 (molecular mass: 55,000 to 57,000; Immunoteck, Marsille, U.S.A.), K8,12 (subtype No. 13, 16; Bio-Yeda) 등의 keratin subtypes, proliferating cell nuclear antigen (PCNA, mouse monoclonal antibody, Dako, Den-

Table 1. Major histological findings during the development of human lip

Gestation age (weeks)	Number (n=231)	Histological findings
7	3	Lip is not defined in the primitive jaw structure.
8	7	Upper and lower lip structures appear by deepening of lingual vestibule.
9-10	10	Upper and lower lip show almost complete shape.
11-12	9	Lower lip is more protruded than the upper lip.
13-14	7	Orbicular oris muscle appears in the center of lip.
15-16	9	Vermilion border becomes conspicuous.
17-18	8	Hair follicles begin to appear.
19-20	5	Vermilion border becomes widened and distinguishable from other structures.
21-22	9	Thick orbicularis oris muscle is located near the vermillion border.
23-24	9	Thickening and keratinization of lip epithelia
25-26	10	Lip structure is almost completed with prominent vermillion border.
27-28	11	Hair follicles and sebaceous glands are well developed in facial skin epithelia.
29-30	18	Prominent rete pegs in oral mucosa epithelia
31-32	17	Hyperkeratinization in the whole lip epithelia
33-34	13	-
35-36	13	-
37-38	15	-
39-40	19	-
over 40	39	-

mark), transglutaminase-C (TGase-C, mouse monoclonal antibody, Neomarkers, Fremont, U.S.A.), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3, mouse monoclonal antibody, Neomarkers), matrix metalloproteinase-10 (MMP-10, mouse monoclonal antibody, Neomarkers), tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1, mouse monoclonal antibody, Neomarkers), tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2, mouse monoclonal antibody, Neomarkers), tenascin (mouse monoclonal antibody, Neomarkers), E-cadherin (mouse monoclonal antibody, Zymed, San Francisco, U.S.A.), S-100 protein (mouse monoclonal antibody, Neomarkers) 등이었으며, 항체의 희석 비율은 1:50-100 정도로 제조사가 권장하는 적정 비율을 사용하였다.

면역조직화학 염색은 위에서 열거한 여러 종류의 항체를 DAKO LSABR[®] kit (DAKO, Denmark)를 이용하여 streptavidin-peroxidase 방법을 사용하였다. 먼저 조직의 파라핀을 제거하기 위하여 크실렌에 15분 담가 둔 다음 100%, 95%, 85%, 70%의 에탄올로 수화시켰으며, 0.3%의 H₂O₂로 5분간 내인성 과산화효소를 비활성화시킨 후 인산염완충액으로 씻어내었다. 여기에 각각의 일차 항체를 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 바이오틴이 결합된 이차 항체로 항온에서 30분간 반응시켰으며, 인산염완충액으로 충분히 세척한 후에 streptavidin으로 다시 30분간 항온에서 반응시켰다. 면역조직화학 반응이 끝난 조직절편은 diaminobenzidine (DAB, Sigma, St. Louis, U.S.A.) 용액에서 약 5분 동안 발색을 시켰으며 헤마톡실린으로 약

하게 대조 염색을 한 후 현미경으로 관찰하였다. 양성 반응 소견은 영상분석기(Image Pro-4.0, Media Cybernetics, Des Moines, U.S.A.)를 통하여 분석하였다.

결 과

조직학적 관찰

임신 7주(배령 5주) 경에 초기의 위턱과 아래턱 구조가 발생했는데, 이때까지는 아직 윗입술과 아랫입술의 구조가 구별되지 않았다. 임신 8주(배령 6주) 경에는 치판(dental lamina)의 형성과 함께 입술쪽 입안 안뜰(vestibule)이 깊어짐에 따라 윗입술과 아랫입술이 처음으로 구별되었다. 임신 9-10주(배령 7-8주) 경에는 윗입술과 아랫입술의 모양이 뚜렷해지고 아랫입술이 윗입술에 비하여 약간 앞쪽으로 돌출되었다. 임신 11-12주(태령 9-10주) 경에는 윗입술과 아랫입술이 얼굴의 하방 부위에서 팽윤되었는데 아랫입술이 윗입술에 비하여 더욱 뚜렷하게 앞쪽으로 돌출되었다. 임신 13-14주부터 입안 점막상피는 단층에서 중층으로 증식하고 PAS에 양성 반응을 보이는 점액다당류의 성분이 입안 점막 상피층에 풍부하게 발현되었다. 한편, 얼굴 피부 상피는 비교적 얇은 세포 층으로 이루어지고 모발기관의 발달이 관찰되었다. 그리고 위턱의 성장이 증가되어 윗입술의 전방 성장이 뚜렷하지만 아직도 윗입술은 아랫입술에 비하여 약간 후방에 위치하였다.

Table 2. Immunohistochemical expression of various antibodies in human fetal lip tissues

Gestation age (wks)	PAS	S-100 protein	PCNA	TGase-C	MMP-3	MMP-10	TN	KL1	K8.12	TK	E-cadherin
7	-	-	++	+	-	-	±	-	-	+	-
8	-	-	+++	+	-	-	+	±	-	++	-
9-10	±	±	+++	++	±	-	+	+	-	++	±
11-12	+	+	+++	++	+	-	++	+	±	+++	+
13-14	+	+	+++	++	+	-	++	++	+	+++	+
15-16	++	++	++	++	+	-	+++	++	+	+++	++
17-18	++	++	++	++	+	-	+++	+++	++	+++	++
19-20	++	++	++	++	+	±	++	+++	++	+++	++
21-22	++	+++	++	++	++	±	++	+++	++	+++	++
23-24	+++	+++	++	+	++	±	++	+++	++	+++	++
25-26	+++	+++	++	+	++	±	++	+++	++	+++	++
27-28	+++	+++	++	+	++	±	++	+++	++	+++	++
29-30	+++	+++	++	+	++	±	++	+++	++	+++	++
31-32	+++	+++	+	+	++	±	+	+++	+++	+++	++
33-34	+++	+++	+	+	++	±	+	+++	+++	+++	++
35-36	+++	+++	+	+	++	±	+	+++	+++	+++	++
37-38	+++	+++	+	+	++	±	+	+++	+++	+++	++
39-40	+++	+++	+	+	++	±	+	+++	+++	+++	++
over 40	+++	+++	+	+	++	±	+	+++	+++	+++	++

PCNA: proliferating cell nuclear antibody, TGase-C: transglutaminase-C, PAS: periodic acid-Schiff, MMP: matrix metalloproteinase, TN: tenascin, TK: total keratin, wks: weeks.

임신 15-16주 경에는 입안 점막 상피와 얼굴 피부 상피의 경계인 홍순 경계의 구별이 가능해지고 윗입술과 아랫입술은 서로 거의 수직 관계가 되었다. 임신 17-18주 경부터는 홍순 경계를 중심으로 바깥쪽으로는 얼굴 피부 상피로, 안쪽으로는 입안 점막 상피로 분명하게 구분되었으며 동시에 입안 점막 상피 내부의 결합조직에서 혈관의 분포가 증가하였다. 입안 점막 상피는 세포 층이 증가하여 두꺼운 상피층이 되며 세포의 부분적 각화가 관찰되었다. 얼굴 피부 상피는 세포층이 얇고 표층 세포에서 증가된 각화 양상이 관찰되었으며 얼굴 피부 상피에서는 털기관과 기름샘이 처음 관찰되었다. 그리고 입안 점막 상피에서는 작은 침샘이 나타났다. 임신 19-20주 경에는 입둘레근의 근육다발이 두꺼워지면서 홍순 경계 부근 점막 상피 내부의 결합조직에 섬유성 근육막(fibrous fascia)을 형성하여 홍순 경계의 폭이 넓어지면서 더욱 뚜렷하게 되었다. 임신 21-22주 경에는 입둘레근의 두께가 증가하면서 윗입술과 아랫입술이 조직학적으로 거의 완전한 성인의 모습을 보였으며, 임신 23-24주 경에는 입술 상피가 전반적으로 두꺼워지면서 각화가 진행되었다. 임신 25-26주 경에는 잘 발달된 홍순 경계를 갖는 입술의 구조가 거의 완성되었고, 임신 27-28주 경에는 입술의 얼굴 피부 상피에서 잘 발달된 털기관과 기름샘이 관찰되었다. 그리고 임신 29-30주 경에는 입술의 구강 점막 상피가 매우 두꺼워지면서 rete peg가 굵고 깊게 발달되었으며 임신 31-32주 경에는 전체 입술 상피에서 과각화 현상이 관찰되었다. 이후부터 임신 40주까지는 입술 구조의 성장 정도는 일정하였다(Table 1)(Fig. 1-1a, b, c).

면역조직화학적 염색 결과

사람 태아 입술 조직의 현미경 절편을 사용하여 각종의 항체를 반응시킨 면역조직화학적 결과는 다음과 같다(Table 2, 3) (Fig. 1, 2).

PCNA

태생기 중의 윗입술과 아랫입술의 상피조직에서 기저층의 세포들에서 빈번한 PCNA 양성 반응을 관찰할 수 있었는데, 특히 임신 15-16주 경 홍순 경계가 구분되는 시기부터 얼굴 피부 상피에 비하여 입안 점막 상피의 기저세포에서 더 빈번한 PCNA 양성 세포가 관찰되었다. 임신 20주 경까지 입술의 성장이 지속됨에 따라 홍순 경계가 넓어지는데 대체로 홍순 경계의 중앙에 서보다는 입안 점막 상피와 얼굴 피부 상피로 이행되는 부분의 기저세포에서 PCNA 양성 세포가 많이 관찰되었다. 또한 얼굴 피부 상피쪽 홍순 경계 상피보다 입안 점막쪽 홍순 경계 상피에서 더 많은 PCNA 양성 세포가 관찰되었다(Fig. 1-2a, b, c).

Tenascin

입술의 상피조직과 중간엽 조직들이 활발하게 증식하는 임신 7-14주 경에는 상피세포와 결합조직 사이에 존재하는 기저막에서 tenascin이 발현되었으나 그 정도는 미약하였다. 그러나 임신 15주 경부터는 홍순 경계 부위에서 입안 점막 상피로 이행되는 상피조직 기저막에서 매우 강한 반응이 관찰되었으며 31주

Table 3. Immunohistochemical detection of various antibodies in the specific areas of human fetal lip tissues

Tissues (cells)	PAS	S-100 protein	PCNA	TGase-C	MMP-3	MMP-10	TN	KL1	K8.12	TK	E-cadherin
Facial skin epithelium											
superficial layer	+	-	-	+	+	-	-	++	-	++	-
keratocyte layer	-	-	-	+	+	-	-	++	-	++	-
basal cell layer	-	±	++	±	+	+	+	+	+	++	±
juxtaepithelial mesenchyme	-	+	-	-	±	±	++	-	-	-	±
Oral mucosal epithelium											
superficial layer	++	-	-	±	++	-	-	++	±	++	-
keratocyte layer	++	-	-	±	++	-	-	++	+	++	-
basal cell layer	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++	+
juxtaepithelial mesenchyme	-	++	-	+	+	+	++	-	-	-	±
Vermilion border											
keratocyte layer	+	-	-	-	+	-	-	++	-	+	-
basal cell layer	-	±	±	++	+	+	+++	+	±	+	++
juxtaepithelial mesenchyme	-	+++	-	±	±	±	+++	-	-	-	+
Minor salivary gland	++	+	+	+	+	-	+	++	+	++	+
Hair follicle	-	±	+	+	++	-	+	++	+	++	+
Sebaceous gland	-	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+
Orbicularis oris muscle	+	-	±	++	+	-	+++	-	-	-	-

PCNA: proliferating cell nuclear antibody, TGase-C: transglutaminase-C, PAS: periodic acid-Schiff, MMP: matrix metalloproteinase, TN: tenascin, TK: total keratin.

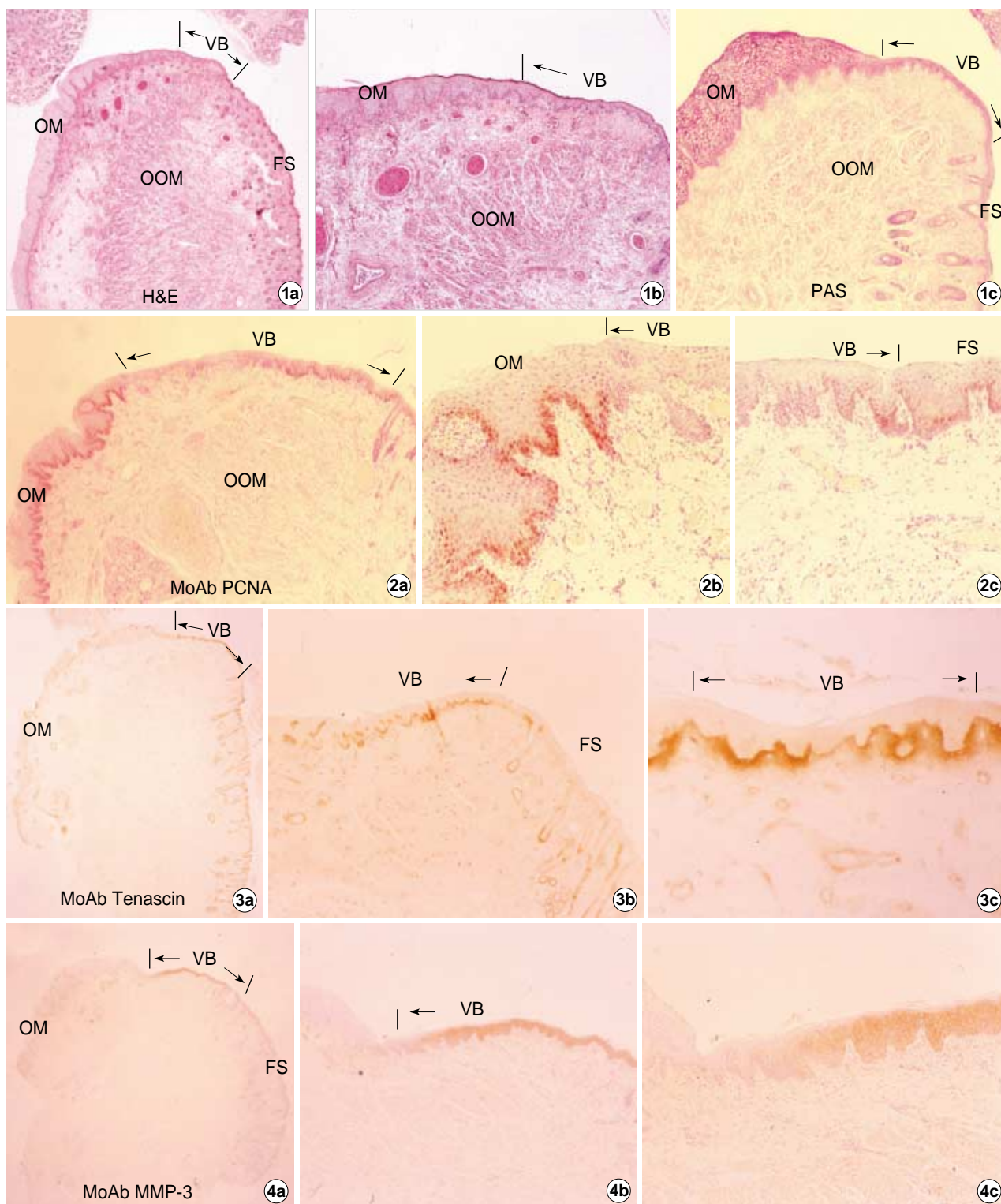


Fig. 1. Histological findings and immunohistochemical detections of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), tenascin and metalloproteinase (MMP)-3 in the fetal lip tissues. 1a-b: 18 weeks of gestation, 1c: PAS staining, 22 weeks of gestation, 2a-c: 20 weeks of gestation, immunostaining of monoclonal antibody (MoAb) PCNA, lingual side epithelium of vermillion border (VB) is more intensely positive than the facial skin side, 3a-c: 25 weeks of gestation, immunostaining of MoAb tenascin, strongly positive in the ectomesenchymal interface of vermillion border tissue, 4a-c: 28 weeks of gestation, immunostaining of MoAb MMP-3, condensely positive in the vermillion border epithelium. OM: oral mucosa, FS: facial skin, OOM: orbicularis oris muscle.

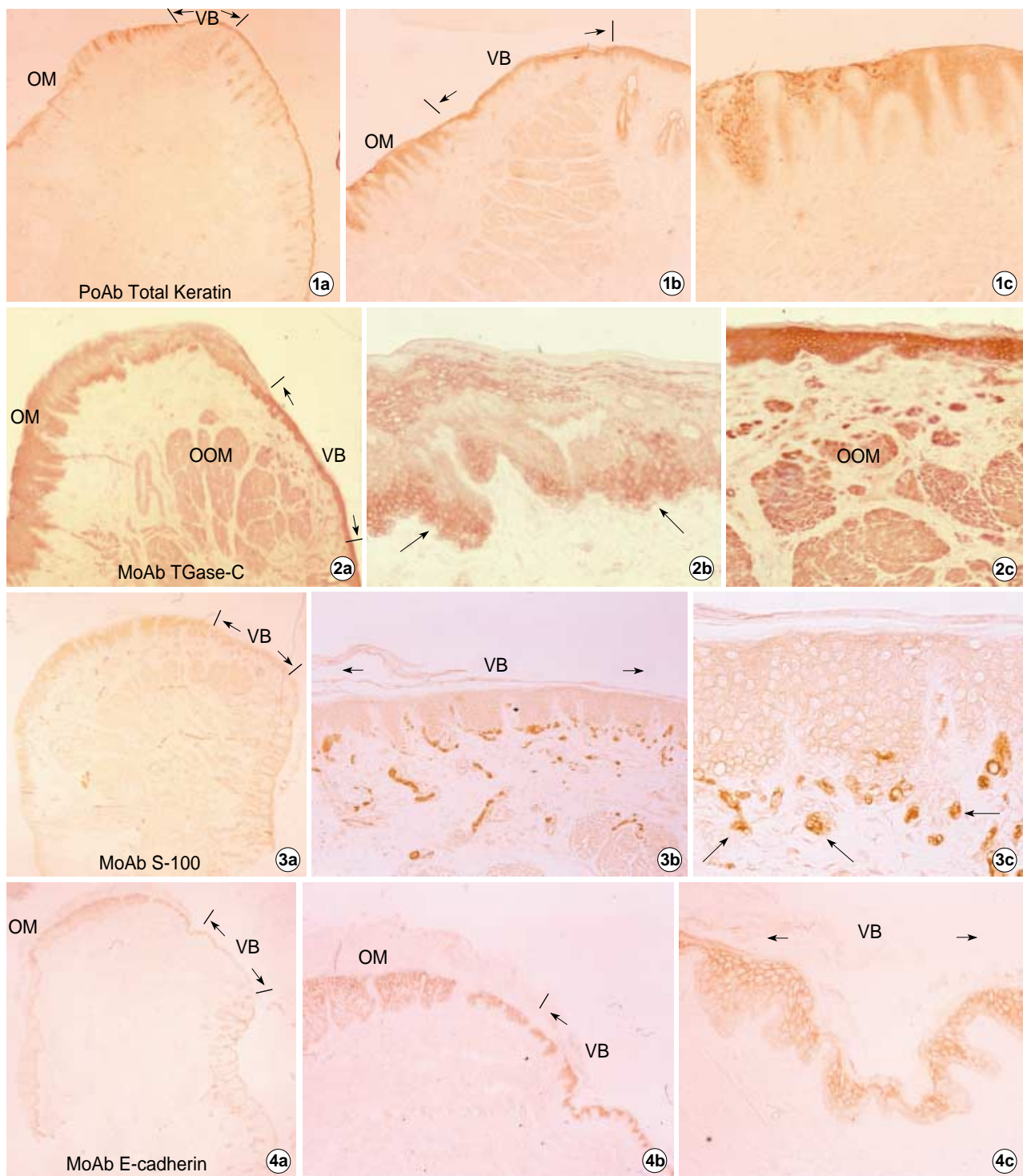


Fig. 2. Immunohistochemical detections of total keratin, transglutaminase (TGase)-C, S-100, and E-cadherin in the fetal lip tissues. 1a-c: 24 weeks of gestation, immunostaining of polyclonal antibody (PoAb) total keratin, strongly positive in the epithelia of lip tissues, 2a-c: 28 weeks of gestation, immunostaining of TGase-C, widely localized at the keratocyte layer and basal layer of vermillion border (VB) epithelium (arrows) and muscle bundles of orbicularis oris muscle (OOM), 3a-c: 26 weeks of gestation, immunostaining of monoclonal antibody (MoAb) S-100 protein, strongly positive in some basal cell of vermillion epithelium and Schwann cells (arrows) of the nerve tissue in the submucosal mesenchyme of vermillion border, 4a-c: 20 weeks of gestation, immunostaining of MoAb E-cadherin, strongly positive in the basal cells of vermillion border tissue and continuously positive in the basal cells of oral mucosa epithelium. OM: oral mucosa, FS: facial skin, OOM: orbicularis oris muscle.

부터는 다시 약하게 발현하였다. 이러한 양성 반응은 얼굴 피부 상피쪽 홍순 경계 조직에서보다 입안 점막 상피쪽 홍순 경계 조직에서 더 강한 tenascin 양성 반응이 지속적으로 관찰되었다(Fig. 1-3a, b, c).

MMP-3와 MMP-10

임신 17-18주까지의 태생 초기의 입술 상피에서는 MMP-3와 MMP-10에 대한 면역반응이 약하게, 그러나 미만성으로 발현되었는데 임신 21-22주 경부터는 면역 반응이 상피조직과 결합조직 내 세포들에서 전반적으로 증가되었다. 특히 MMP-3는 입술의 상피세포에만 국한된 양성 반응을 보였는데 얼굴 피부 상피보다는 입안 점막 상피의 기저세포층에 강한 양성 반응을 보였다(Fig. 1-4a, b, c). MMP-10은 입안 점막 상피와 얼굴 상피의 기저세포층에 약하게 양성을 보였으나 그 외의 세포나 조직에서는 음성이었다.

Keratins

윗입술과 아랫입술의 상피 조직에서 TK의 발현이 임신 10주 경부터 뚜렷하게 나타나며 KL1, K8.12 등의 발현은 임신 12주 경부터 분명하게 구분되어 관찰되었다. 이들 여러 종류의 각질들은 입술의 홍순 경계 부위 상피에는 비교적 약한 양성 반응을 보였는데, 이 중에서 K8.12는 홍순 경계 부위 상피의 기저층에서 지속적인 강한 양성 반응을 보였다(Fig. 2-1a, b, c).

TGase-C

태생기의 윗입술과 아랫입술 조직에서 TGase-C의 면역조직화학 반응이 상피세포와 근육세포 등에서 지속적인 양성으로 나타났다. 특히 상피의 증식이 활발한 임신 9-22주 사이에는 거의 모든 상피조직의 기저세포층에서 강한 양성 반응을 보였으며 임신 15주 경부터 홍순 경계가 구분되는 시기에는 홍순 경계 부위 상피의 기저세포층에 국소적으로 강한 양성 반응을 보였다. 특히 이 시기에 입술의 중앙 부위에 위치하면서 증식하는 입둘레근의 근육다발에서도 TGase-C의 반응이 관찰되었는데, 홍순 경계 부위 상피에 접근하는 근육다발이 특히 강한 반응을 보였다(Fig. 2-2a, b, c).

S-100 단백질

태생기 중에 S-100 단백질은 입술 조직 내에 분포된 신경집 세포, Langerhans 세포, 그리고 멜라닌 세포 등에서 고르게 양성 반응을 보였는데 이러한 특이한 양성 반응의 분포는 임신 14주 경까지는 입술 상피 기저층과 내부의 결합조직에 광범위하게 나타났다. 임신 15주 경부터 홍순 경계가 구분되는 입술 조직에서

는 홍순 경계 부근의 상피 기저층과 인근의 결합조직에 S-100 단백질에 양성 반응을 보이는 신경집 세포의 숫자가 점차 증가되어 말초신경의 분포가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2-3a, b, c).

E-cadherin

태생기 중에 입술 상피의 증식이 활발한 임신 7-14주 경에는 입술 상피의 기저막 부위에서 E-cadherin의 면역조직화학 반응이 거의 나타나지 않았으나 임신 15주 이후에 홍순 경계가 구분되면서 홍순 경계 부위 상피의 기저막에서 E-cadherin의 양성 반응이 뚜렷하게 관찰되었다. 임신 18주 이후에 입술의 모양과 구조가 성숙됨에 따라 E-cadherin의 면역반응이 홍순 경계 상피 전체에서 강하였고, 입안 점막으로 이행됨에 따라 그 반응은 대체로 감소되었다. 이러한 양성 반응은 얼굴 피부 상피쪽 홍순 경계 조직에서보다 입안 점막 상피쪽 홍순 경계 조직에서 더 강한 E-cadherin 양성 반응이 관찰되었다(Fig. 2-4a, b, c).

TIMP-1와 TIMP-2

태생기 중 조사한 모든 시기에서 입술 상피에서 TIMP-1과 TIMP-2의 면역 반응이 어떤 부위에서도 전혀 관찰되지 않았다.

고 찰

입안 점막은 태생 초기에 구와(stomodaeal) 상피에 의하여 발생된 주머니와 같은 구조를 이루어서 위장관 점막과는 발생학적으로 다르게 구별된다.³ 입안 점막 상피에서는 치배, 타액선 등의 기관을 형성하며 피부의 상피에 비하여 매우 두꺼운 세포층을 이루고 잘 발달된 rete peg를 보이고 있다.¹⁹ 입술 조직은 입안 점막 상피와 피부 상피를 연결하는 부위로서 안쪽에는 입안 점막 상피의 특성을 갖고 바깥쪽은 피부 상피를 갖게 되는데, 그 중간 부분을 특히 홍순 경계라 한다.⁴ 홍순 경계의 상피세포 분화가 매우 특이할 것으로 여겨지는데 이에 대한 자세한 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 사람 태아에서 입술의 발달 과정을 형태학적, 면역조직화학적으로 관찰한 결과, 입술 발달에 있어서 입둘레근과 홍순 경계가 밀접한 연관성이 있는 것으로 관찰되었다. 즉, 입둘레근이 부착되는 곳에 E-cadherin, tenascin, TGase-C 등의 부착성 단백질들이 많이 분포한다는 것은 홍순 경계가 얼굴의 여러 근육들의 부착을 유도하는 중요한 중심이 된다는 것을 의미한다. 실제로 입술의 홍순 경계에 입둘레근이 부착됨으로 인해 입술의 조임의 역할, 발음의 역할, 그리고 강력한 흡인을 할 수 있는 기능 등이 생긴다.¹³

홍순 경계를 중심으로 바깥쪽으로는 얼굴 피부의 상피로, 안쪽으로는 입안 점막 상피로 구분된다. 이 둘은 구조적으로 매우 다르며 발생학적으로 서로 비교가 되는 물질들이 발현되어서 주

로 얼굴 피부 상피쪽 흉순 경계에서는 다양한 종류의 cytokeratin (KL1, K8,12, total keratin 등)들의 발현이 증가되었고, 입안 점막 상피쪽 흉순 경계에서는 tenascin, E-cadherin 및 TGase-C 등의 발현이 현저하였다. 이들의 환경적 차이는 얼굴 피부 상피쪽 흉순 경계는 외부에 위치하여 양수에 젖어 있고 입안 점막쪽 흉순 경계는 침으로 젖어 있으며 윗입술, 아래 입술 그리고 혀 등에 의하여 서로 닿아 있다. 조직학적으로는 피부의 상피는 각화가 아주 잘 되어 있지만 입안 점막의 상피는 비각화 또는 부분 각화 상피세포로 되어 있다. 얼굴 피부의 상피는 일정한 기간을 두고 각화상피가 계속 떨어져서 상피층이 얇고, 입안 점막의 상피는 세포증식에 비하여 탈락성이 낮아서 점차 두꺼워지는데, 입안 점막 상피의 바깥층에 있는 비각화 점막 상피세포는 타액의 단백분해효소들에 의하여 천천히 떨어지게 된다.¹⁹ 본 연구에서는 입술의 피부 상피보다는 입안의 점막 상피에서 단백질 분해 활성도가 현저히 증가하는 것이 관찰되어서 이러한 현상이 외배엽성 상피세포를 입안 점막 상피로 발달시키는 원인으로 생각되었다. 그에 비해서 입술의 피부 상피에는 단백질 분해효소가 표층의 세포에만 존재하고 기저부 쪽에는 거의 없는 것으로 보아 단백질 분해 효소와 항 단백질 분해 효소의 균형이 입술에 있는 두 가지 종류의 상피세포의 유형을 결정하는 것으로 추정되었다.

입술의 구조와 발생이 태생기 6-8주 사이에 초기 형성 과정을 보이는데, 이때는 입안 점막과 얼굴 피부 상피의 조직학적 구별이 없고 흉순 경계도 관찰되지 않았다. 입안 점막의 발달과 입술 속에서 자리잡는 입둘레근의 발달 및 얼굴 피부 상피의 발달이 구별됨에 따라, 입술의 발달 시기보다는 늦은 시기인 15-16주 경에 흉순 경계가 발달하는 것을 관찰하였다. 즉, 흉순 경계가 입술 구조보다 늦게 발생된다는 것은, 흉순 경계에서 발견되는 매우 활발한 상피 증식이 입안 점막을 만드는 초기의 성장 중심이 아니라 입술 구조를 만들고 기능을 부여하기 위한, 이차적인 성장 지역의 역할을 하는 것이라는 점을 말해준다.²⁵ 입술에서의 상피세포의 증식성을 보면 흉순 경계 부위에서 상당히 증식성이 높았는데 구체적으로 분석하면 대체로 흉순 경계에서 입안 점막 상피쪽으로, 그리고 흉순 경계에서 피부 상피쪽으로 증식성이 활발해지는 것이 관찰되었다. 이는 흉순 경계 중심 부위의 상피세포들은 마치 줄기세포가 휴지기에 있는 것처럼 외형적으로는 S 또는 G2 세포 주기를 나타내는 PCNA 면역 염색에 음성 반응을 보이지만 얼굴 상피쪽이나 입안 점막 상피쪽 흉순 경계 상피에서는 그 증식성이 증가되었으므로, 입술의 발생 과정에서 흉순 경계의 역할이 중요할 것으로 추측된다. 또한 흉순 경계는 성장 발육이 활발한 태생기에는 그 두께가 상당히 두껍다가 생후 성장이 완성된 시기에는 두께가 얇아져 하나의 선상으로 보이게 되는데, 이것은 태생기 및 성장기에는 흉순 경계가 입안 점막과 피부의 성장을 보충해 주는 원기 세포의 저장고로서 입술의 이차적 성장이 흉순 경계를 중심으로 피부와 입안 점막 쪽으로 빠르게 진행되기 때문이라는 주장과 일치한다.²⁶ 따

라서 본 연구에서는 흉순 경계의 증가된 상피세포의 증식성과 함께 입술의 기능적 성숙이 이루어지는 태생기 동안에 이차적으로 필요한 입술 상피 조직의 증가의 일부가 흉순 경계 상피조직의 활발한 증식이 보충적 역할을 할 것으로 추측하였다.

Tenascin은 중간엽에서 만들어지는 세포외 간질 당단백으로 상피세포와 중간엽세포 사이의 신호 전달에 있어서 매우 잠재적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 배아기의 조직에는 풍부하게 발현되지만 성장이 완료된 조직에서는 발현이 미약하다. 그리고 tenascin은 여러 조직의 발생 및 성장 과정들을 조절하는 물질이며, 기관발생, 발생, 그리고 상처의 치유시에 나타나는 세포간질의 구성요소로서 세포증식 및 분화를 조절하고, 배아기의 골발생 시에도 특징적으로 나타나 초기의 뼈모세포 분화의 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁶ Tenascin은 상피세포와 중간엽세포 사이의 경계면에서 만들어져서 상피세포의 분화를 촉진시킨다고 알려져 있는데, 중간엽세포뿐 아니라 상피세포에서 직접 만들어서 분비되는 것으로 생각되는 단백질이다. 면역조직화학염색에서 이 물질의 발현은 조직의 분화, 상처의 치유, 그리고 종양의 존재를 나타내주는 중요한 요소가 된다. 본 연구에서 살펴 본 입술의 흉순 경계에 tenascin이 집중적으로 발현된다는 사실은, 이 물질이 이 부위의 발생에도 큰 역할을 하는 물질이라는 점을 알 수 있게 해 준다. Tenascin이 중요하고 특별한 조직을 만드는 부위에서 발현되기 때문에 거꾸로 생각하면 흉순 경계는 입술에서 중요한 부위라는 것을 짐작할 수 있다.

MMPs는 조직이 변성되었을 때 주위의 세포의 사이질로부터 분비되어 세포외 사이질의 개조에 사용되는 단백질들이다. 이 단백질은 혈관이 손상되었을 때, 발현이 증가되어 민무늬근육 세포의 이주반응에 기여하며, 혈관 손상의 개조에 참여하는 것으로 알려져 있다. 또한 인체 장관의 점막 손상에도 손상된 조직의 대체 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 관절염시에 MMPs가 연골의 아교질 퇴화과정에 전아교질분해효소를 활성화하여 연골의 아교질 파괴를 조절하는 것으로 알려져 있다.²⁷ 이 단백질은 조직의 대체 및 재생 시에 사용되는 단백질로서, 이 물질의 발현은 조직 손상이나 파괴 시 새로운 조직으로의 대체에 기여한다고 할 수 있다. 본 연구에서 MMP-3가 흉순 경계 부위에서 피부보다는 입안 점막 상피의 기저세포층에 강한 양성 반응을 보였다. 이는 흉순 경계가 신속하게 새로운 조직으로 재생되는 것을 의미하며, 이러한 신생조직의 발달이 입안 점막 부위가 피부 상피보다 훨씬 활발한 것으로 관찰되었다.

TGase-C는 교차결합 효소(cross-linking enzyme)로 몇몇 단백질들의 교차결합에 의해 상피의 방어벽을 형성시켜 주는 효소로서 주로 상피에서 넓게 발현되는 물질이다. TGase-C에 의한 교차결합은 단백질간의 전자공유결합(covalent bonding)으로 매우 안정되고 단단한 결합이며, 또한 이 효소는 세포의 생명에 매우 중요한 다른 생체 반응들도 촉매하는 것으로 알려져 있다. 입술의 흉순 경계 근처에서 근육이 이 부위의 섬유성 근

막에 달라붙을 때 TGase-C가 역할을 하는 것으로 생각할 수 있는데, 홍순 경계 부위에 접근하는 입둘레근의 근육다발에서 TGase-C의 강한 양성 반응이 관찰됨을 이 연구를 통해 확인할 수 있었다. 즉, 이 물질이 홍순 경계에 근육들이 부착하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 설명할 수 있다.²⁸

E-cadherin은 칼슘 의존성의 세포 부착물질로서 상피에서 세포와 세포 사이의 상호관계에 중요하며, 상피층의 구조와 완전성을 유지하는데 주된 역할을 하는 물질이다. 기관발생에서 상피세포가 파고 들어갈 때 이 물질이 없으면 상피세포의 부착이 이루어질 수 없고, 털주머니 등의 부속기관들이 파고 들어갈 때에도 E-cadherin이 존재하여 기관발생을 할 수 있게 한다.²⁹ 그러므로 여기에서 임신 15주 이후에 홍순 경계가 구분되면서 홍순 경계 부위 상피의 기저막에서 E-cadherin의 양성 반응이 뚜렷하게 관찰되고, 임신 18주 이후에 입술의 모양과 구조가 성숙됨에 따라 E-cadherin의 면역반응이 홍순 경계 상피 전층의 세포에서 강하게 관찰되었다는 사실은 홍순 경계 부위에 E-cadherin이 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

세포의 증식을 관찰할 수 있는 PCNA 면역 염색과 함께 S-100 단백질 면역 염색에서 홍순 경계의 상피를 중심으로 매우 활발한 양성 반응이 관찰되었으며, 특히 홍순 경계 점막 상피하에 신경조직 말단 분포와 모세 혈관의 풍부한 분포가 함께 발견되어서 홍순 경계 점막 상피의 세포증식을 촉진하게 하는 것으로 추측된다. 본 연구에서 태생 초기의 입술에서 홍순 경계 상피의 세포 증식과 풍부한 신경 분포가 관찰되는 것은, 구와의 발생 시부터 홍순 경계는 매우 특이한 형태와 기능 발달이 생기는 것을 의미하며 사람에서는 두터운 입술 조직을 형성하고 성인에 이르기까지 계속되어 다양한 입술의 기능을 유지하는 것³⁰과 관련이 있을 것으로 추측하게 한다.

이상과 같은 결과들을 요약하면, 주요한 단백질들의 발현 양상이 홍순 경계를 중심으로 활발하게 나타나는데, 태생 초기에는 입안 점막과 얼굴 피부 상피를 구분하지 않고 홍순 경계에서 비교적 미만성으로 발달되다가, 입안 점막 상피가 발달하고 얼굴 피부 상피가 발달함에 따라 각각 특이한 단백질이 발현되었다. 그리고 이러한 홍순 경계의 발달은 태생 13-14주까지는 주위의 점막 상피 혹은 얼굴 피부 상피와 크게 구별되지 않다가 태생 15-16주부터 매우 특이한 홍순 경계 구조를 이루었다. 입술이 입안 조직과 피부조직 사이에서 풍용되어 이차적으로 발생되었듯이 입술의 홍순 경계도 태생 초기에는 거의 구별되지 않고 부근의 점막 상피와 같은 구조를 이루다가 계속되는 입술의 발달에 따라 이차적으로 형성된 기관으로 여겨진다. 사람의 태아 입술에서 홍순 경계는 발생 초기에 독립된 기관으로 생긴 것이 아니고 임신 15-16주 경에 형성된 이차적인 구조로서 태생기 중에 입술이 성장 및 발육하는 동안 홍순 경계를 중심으로 입술의 구조가 성숙되는 것으로 관찰되었다. 이렇게 홍순 경계가 입술의 구조보다 늦게 발생한다는 점은, 홍순 경계에서 발견되는 매우 활발한 상피 증식이 구강 점막을 발생시킨 초기의 성장 중

심이 아니라 이차적인 입술 구조를 형성시키고 기능을 발달시키기 위한 보존적인, 이차적인 성장 지역임을 의미한다. 따라서 홍순 경계에 있는 미분화 상피세포는 태생 초기부터 입안 점막 상피나 얼굴 피부 상피 세포를 특이하게 발달시키기 위한 어미세포의 역할을 하기보다는 홍순 경계에 있는 입안 점막 상피와 얼굴 피부 상피의 증식성 상피 세포가 홍순 경계의 이차적 증식 및 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 볼 수 있다. 어쨌든, 태아 입술의 홍순 경계 부위의 상피 세포에서 증식성이 활발하여 PCNA 양성 반응이 빈발하고 tenascin, E-cadherin, TGase-C, 그리고 여러 종류의 cytokeratin들이 강하게 발현하는 현상은 태아 입술의 홍순 경계가 태생기 입술 발달에 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다. 본 연구에서는 태아 입술에서 홍순 경계에 특징적으로 나타나는 면역조직화학적 발현 물질들이 세포 증식(PCNA)뿐 아니라 상피와 중배엽조직의 상호작용(ectomesenchymal interaction)을 유도하는 물질(tenascin, E-cadherin, TGase-C, MMP-3 및 MMP-10), 그리고 세포분화 물질(TK, KL1, K8,12 및 S100 단백질) 등이 있음을 확인할 수 있었으므로, 태아 입술의 홍순 경계를 중심으로 입둘레근의 부착, 신경 말단의 분포, 그리고 입술상피 세포의 분화와 증식이 복합적으로 이루어지는 것으로 추측된다.

참고문헌

1. Farkas LG, Posnick JC, Hreczko TM. Growth patterns of the face: a morphometric study. *Cleft Palate Craniofac J* 1992; 29: 308-15.
2. Ferrario VF, Sforza C. Size and shape of soft-tissue facial profile: effects of age, gender, and skeletal class. *Cleft Palate Craniofac J* 1997; 34: 498-504.
3. Kuehn DP. Orofacial embryology, anatomy and physiology. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980; 89: 138-41.
4. Latham RA, Deaton TG. The structural basis of the philtrum and the contour of the vermilion border: a study of the musculature of the upper lip. *J Anat* 1976; 121: 51-160.
5. Ferrario VF, Sforza C, Schmitz JH, Ciusa V, Colombo A. Normal growth and development of the lips: a 3-dimensional study from 6 years to adulthood using a geometric model. *J Anat* 2000; 196: 415-23.
6. Asahina I, Sakakibara T, Miyashin M, Tachikawa N, Enomoto S. Congenital midline sinus of the upper lip: case report and review of literature. *Cleft Palate Craniofac J* 1997; 34: 83-5.
7. Barlow SM, Bradford PT. Comparison of perioral reflex modulation in the upper and lower lip. *J Speech Hear Res* 1996; 39: 55-75.
8. Meyer PG. Tongue lip and jaw differentiation and its relationship to orofacial myofunctional treatment. *Int J Orofacial Myol* 2000; 26: 44-52.

9. Frederick S. The perioral muscular phenomenon: Part I. *Aust Orthod J* 1991; 12: 3-9.
10. Burke PH. Serial growth changes in the lips. *Br J Orthod* 1980; 7: 17-30.
11. Johnston MC, Millicovsky G. Normal and abnormal development of the lip and palate. *Clin Plast Surg* 1985; 12: 521-32.
12. Couly G. Microscopic anatomy and muscle architecture of the commissure of the lips in the newborn infant and the adult. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1976; 77: 789-99.
13. Fernandez Villoria JM. A study of the development of the orbicularis oris muscle. *Plast Reconstr Surg* 1975; 55: 205-13.
14. Raphael B. Labial function. Its role in facial morphogenesis. *Ann Chir Plast* 1981; 26: 107-11.
15. Hashim HA, Sarhan OA, Bukhary MT, Feteih R. Vertical and horizontal linear growth of the maxillary and mandibular lips: a longitudinal study. *J Clin Pediatr Dent* 1997; 21: 125-9.
16. Hotz M. Orofacial development under difficult conditions. *Fortschr Kieferorthop* 1983; 44: 257-71.
17. Hotz MM. Orofacial development under adverse conditions. *Eur J Orthod* 1983; 5: 91-103.
18. Johnston MC, Bronsky PT. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 25-79.
19. Bhaskar S N. Orban's oral histology and embryology, 8th ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 1976; 292-3.
20. Hashimoto K. Fine structure of horny cells of the vermilion border of the lip compared with skin. *Arch Oral Biol* 1971; 16: 397-410.
21. Barlow SM, Finan DS, Rowland SG. Mechanically evoked perioral reflexes in infants. *Brain Res* 1992; 599: 158-60.
22. Bronshtein M, Zimmer EZ, Offir H, Blazer S. Fetal mustache in early pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12: 252-3.
23. Counihan D. Arch development and facial esthetics. *J Clin Orthod* 1998; 32: 13-23.
24. Gotfredsen E, Kragsskov J, Wenzel A. Development of a system for craniofacial analysis from monitor-displayed digital images. *Dentomaxillofac Radiol* 1999; 28: 123-6.
25. Grossen J, Ingervall B. The effect of a lip bumper on lower dental arch dimensions and tooth positions. *Eur J Orthod* 1995; 17: 129-34.
26. Lee ST. A histological study of the philtrum. *Ann Acad Med Singapore* 1988; 17: 328-34.
27. Khan KM, Falcone DJ, Kraemer R. Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase 9 expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 2353-9.
28. Jones RA, Nicholas B, Mian S, Davies PJ, Griffin M. Reduced expression of tissue t transglutaminase in a human endothelial cell line leads to changes in cell spreading, cell adhesion and reduced polymerisation of fibronectin. *J Cell Sci* 1997; 110: 2461-72.
29. Downer CS, Speight PM. E-cadherin expression in normal, hyperplastic and malignant oral epithelium. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1993; 29: 303-5.
30. Johnston MC, Bronsky PT. Embryonic craniofacial development *Prog Clin Biol Res* 1991; 373: 99-115.