

백서의 실험적 치아 이동시 치주조직내 성장인자 발현에 관한 면역조직화학적 연구

이 준 형¹⁾ · 김 상 철²⁾ · 국 윤 아³⁾

교정력에 의한 치아이동시 치주조직의 조직변화를 알아보고 성장인자중의 하나인 Epidemal Growth Factor (EGF)의 시간 경과에 따른 발현정도 및 분포 변화를 알아 보고자, Sprague-Dawley계 백서 23마리를 대조군(3마리)과 실험군(20마리)으로 나누었으며, 실험군은 교정력(75g)을 가한 후 12시간, 1일, 4일, 7일, 14일이 경과한 후 각각 4마리씩 희생시켜, EGF의 발현 분포와 조직학적 변화를 면역조직화학적 및 조직병리학적으로 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 교정력을 가한 후 14일 까지, 견인측의 치주인대 섬유는 신장되었고, 압박측의 치주인대 섬유는 압축되었으며 치주인대섬유 배열의 완전회복은 일어나지 않았다.
2. 대조군의 EGF 발현은 구강상피, 전상아질, 치수와 치주인대내의 혈관에서 진하게 발현되었으나, 파골세포 및 골아세포에서는 미약한 염색상을 보였다.
3. 교정력을 가한지 12시간, 1일, 4일, 7일째 실험군의 치주조직에서의 EGF의 발현은 견인측과 압박측의 차이가 없이, 경미한 미만성의 양성반응을 보였다.
4. 교정력을 가한지 14일째 치주조직에서 EGF의 발현이 현저히 증가되었으며, 압박측보다 견인측이 더 많이 발현되었으며, 치경부 쪽보다 치근단 쪽에서 더 많았다.

(주요단어 : 치아이동, 교정력, EGF)

I. 서 론

치아에 교정력을 가하면 치조골과 치주인대를 비롯한 모든 치주조직에 변화가 초래되어, 압박측에서는 파골세포의 활성증가로 골의 흡수가 일어나고, 견인측에서는 골아세포의 활성 증가에 따른 골침가가 일어나는 골의 개조와 함께 치아이동이 이루어진다¹⁻¹¹⁾.

Sandstedt¹⁾가 처음으로 개를 대상으로 골개조 과정에서의 조직적 소견을 연구하기 시작한 이래, Storey를 비롯한 다수의 선학들은¹²⁻¹⁶⁾ 치아 이동시의

골흡수와 침착의 기전을 보다 잘 이해하기 위하여 교정력의 크기와 그 적용기간을 포함한 여러 교정력의 요소들을 고려하여 그에 따른 치아이동 양상의 차이를 알아보고자 하였다.

골개조에 대한 조직학적 관찰 뿐 아니라 치아이동시의 치주조직내 세포의 활성도에 대한 연구가 Fitzgerald등¹⁷⁾에 의해 [³H]이 소개되면서 가능해졌다. 자기방사법을 이용하여 DNA합성 과정에 있는 세포의 분열과 분화를 추적 또는 표지할 수 있어 골개조를 일으키는 세포들의 활성 상황을 파악할 수 있다¹⁸⁾.

또한 Davidovitch등¹⁹⁾과 Norton등²⁰⁾, 김등²¹⁾은 골개조 반응을 생화학적 그리고 세포생물학적으로 규명하기 시작하였다. 그후 치아이동에 따른 여러 호르몬의 분포와 농도의 변화에 관해 많은 연구가 진행되

1) 원광대학교 치과대학 치과교정학교실, 박사과정

2) 원광대학교 치과대학 치과교정학교실, 부교수

3) 원광대학교 치과대학 치과교정학교실, 조교수

어, 세포활성과 조직변화는 치주조직내 특정성분의 변화와 밀접한 관계가 있다고 밝혀졌으며⁸⁾, 세포반응을 촉발시키는 인자로 growth factor의 역할이 도입되기에 이르렀다⁵⁾.

1962년 Cohen²²⁾이 epidermal growth factor(EGF)를 처음 발견한 이래, platelet-derived growth factor(PDGF), endothelial cell growth factor(ECGF), nerve growth factor(NGF), insulin-like growth factor(IGF), fibroblast growth factor(FGF) 등의 많은 성장인자가 발견되었으며 각각에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다²³⁾.

성장인자는 세포의 성장을 촉진하고 생활력을 유지하도록 하는 생물학적 작용물질 중의 하나로 호르몬과 유사하나 선택적으로 특정세포의 주화성(chemotaxis)과 증식에 관여하는 요소라 하였다^{23,24)}.

생쥐 치아의 맹출과 안검 개방을 촉진하는 효과를 보이는 것으로 알려져 있는 EGF는²²⁾ 분자량이 6,045이고 53개의 아미노산으로 이루어진 single chained polypeptide로 되어 있는 일종의 호르몬으로 사람을 비롯한 거의 모든 포유동물의 약하선 및 여러조직으로부터 분비되어 혈액, 뇨, 유즙, 타액, 양수 등 모든 체액내에서 존재하여 각종 조직이나 세포의 생리활성에 밀접히 관여하는 것으로 알려져 있다^{25,26)}. [125I]로 표지한 조직학적 연구²⁷⁾에서 EGF는 백서 절치의 법랑질 및 발육중인 치근단조직, 생쥐의 치배간엽세포, 사람의 치배 및, 구강상피, 법랑기의 유두세포들, 치주인대 섬유아세포, 전조골 세포 등에 분포하는 것으로 나타났다.

EGF는 여러 종류의 세포의 분화를 촉진하는 것으로 보이며²⁸⁾, 특히 표피세포의 분열을 촉진시킬 뿐 아니라 세포 형태 및 분화시 관계되는 여러 호르몬의 합성 및 분비, 세포 단백질의 인산화^{29,30)}에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

또한 EGF는 구강조직의 발생과 유지에 관여하며 특히 치성세포의 분열을 촉진하며³¹⁾, 치수조직에서는 상아질 형성을 조절하는 것으로 알려져 있다³²⁾. Thesleff³³⁾가 시험관내에서 자기방사법을 이용하여 연구한 결과, Malassez 상피잔사가 EGF에 대해 강한 친화성을 보이는 것을 밝혀냈다.

골세포에 대한 EGF의 작용에 있어서, Canalis와 Raisz³⁴⁾은 시험관내 실험에서 EGF에 의해 골내의 DNA합성이 촉진되고 교원섬유 합성은 억제된다고 하였다. 또한 Bergler등²⁹⁾이 시험관내에서 면역조직

화학 염색법을 이용한 연구 결과 섬유아세포, 골아세포도 큰 친화성을 나타낸다고 하였다.

이와같이 EGF는 많은 생리적 과정 뿐 아니라 염증 반응을 포함한 병리학적 과정에 관여하는 세포활성 물질로 여겨지고 있으며^{25, 35)}, 염증반응 및 치유과정으로 여겨지고 있는 치아이동 및 그에 따른 치주조직 변화에서도 EGF의 역할이 클 것으로 사료된다. 그러나 골조직에 대한 EGF의 영향에 대한 현재까지의 연구는 시험관내에서의 친화성에 대한 것이 대부분이며 생체에서 치아이동시의 EGF의 역할에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는, 교정력에 의한 치아이동시 치주조직의 조직변화를 알아보고 성장인자중의 하나인 EGF의 시간 경과에 따른 발현정도 및 분포 변화를 알아보고자 백서 전치에 교정력을 가한 후 희생시켜 EGF에 대한 면역조직화학적 염색(LSAB염색) 및 조직화학적 염색을 시행하여 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1) 실험대상

체중 200g 내외의 생후 5주령인 Sprague-Dawley 계 백서 23마리를 연형사료로 사육하였다. 이들을 대조군(3마리)과 실험군(20마리)으로 나누었으며, 실험군은 교정력(75g)을 가한 후 12시간, 1일, 4일, 7일, 14일이 경과한 후 각각 4마리씩 희생시켰다.

2) 실험방법

가) 견인 스프링 장착

견인력에 의한 백서 상악전치의 원심이동은, Southard등의 방법³⁶⁾을 좇아 helical spring (0.014" stainless steel)을 이용하였으며, tension gauge를 사용하여 발휘되는 교정력의 크기(75g)를 확인하였다. 염산 케타민(Ketalar; 유한양행)을 백서 둔부에 주입하여(체중 kg당 5-10mg) 마취한 후, 상악절치의 순면과 원심면에 1/4 round bur로 홈을 형성하여 helical spring의 유지에 도움이 되게 하였다. 상악 양 중절치의 원심면에 0.009" 결찰선을 이용하여 helical spring을 부착시키고, 하악절치는 상악절치의 마모와 장치의 손상을 피하기 위하여 삭제하였다(Fig.1).

Table 1. Histopathologic Findings of Control and Experimental Groups

	tearing of PDL	hyalinization of PDL	bone apposition	bone resorption	inflammatory cell infiltration		vascular capillary dilatation proliferation	
	tension side	pressure side	tension side	pressure side	tension side	pressure side	tension side	pressure side
control	±	±	±	±	±	±	±	±
12H	+	±	±	±	±	+	±	±
1D	++	±	±	+	+	+	+	±
4D	+	±	+	+	±	±	++	+
7D	±	±	++	++	±	±	+	++
14D	±	±	+++	+++	±	±	+	±

±;rare +;mild ++;moderate +++;severe

나) 광학현미경 표본 제작 및 조직학적 염색

장치를 제거한 후 희생시켜, 전치가 포함된 상악을 전두면 방향으로 4등분하여 전치의 치경부위, 치근 중앙부위, 치근단부위 및 구개부위의 조직괴를 만들어, 2일간 10% 중성 포르마린용액에 고정하고, 10% EDTA로 10일간 탈회한 후, 통법에 의하여 탈수하고 파라핀에 포매했으며, 4-6µm의 박절표본을 poly-L-lysine을 도포한 슬라이드에 부착하여 표본을 제작하였다. 교원섬유 및 치주인대섬유의 형태 관찰과 치주조직의 변화를 알아보기 위해 H & E, Masson's trichrome, periodic acid schiff(PAS)염색을 시행하여 검경하였다.

다) 면역조직화학적 염색

LSAB(labelled streptavidine biotin, Dako Co., USA)을 이용하였는데 일차항체는 EGF ab-3(Oncogene science Co.)를 이용하였고 발색은 diaminobenzidine kit(DAB, Vector lab.)를 이용하였다. 파라핀 절편을 탈파라핀화 및 수화시킨 후 일차항체인 EGF를 1 : 10으로 희석해 10분간, 이차항체(anti-mouse IgG, Vector Lab.)를 10분간 부란시켰다. streptavidine alkaline phosphatase로 10분간 처리한 후 0.035% H₂O₂를 함유한 0.02% DAB으로 발색시킨 후 Harrison hematoxilin으로 대조 염색하여 glycerin으로 도포 후 검경하였다. 음성대조군은 일차항체 대신 생리식염수를 사용한 후 동일한 방법으로 염색하였다. 염색의 판정은, 전혀 염색되지 않거나 세포의 표면에 염색된 흔적이 약하게 관찰된 경우를 음성으로, 세포내 붉은 반점으로 명확히 염색되는 경우를 양성으로 구분하여 치주인대내의 염색정도를 경도, 중등도, 심도의 3단계로 나누었다.

Ⅲ. 연구성적

가. 대조군

1) 치주조직 변화(Table 1)

양 중절치 사이의 치간유두는 5-6층의 편평상피로 덮혀 있었으며 치주인대 섬유도 정상적으로 배열되어 있었다. 치주인대 간격은 근원심으로 양측이 같았고 치조골면에서는 규칙적인 골아세포가 배열되어 있었으며 파골세포에 의한 골흡수는 관찰되지 않았다(Fig.2).

2) 상피성장인자(EGF)의 발현(Table 2)

모든 치주조직에서 미만성으로 경미한 양성반응을 보였는데, 특히 구강상피의 각화층 및 과립층, 전상아질, 치수와 치주인대에서의 혈관 내피세포와 혈관내강에서 진하게 발현되었으나 모든 치주섬유는 거의 음성반응을 보였으며, 치조골 내부와 파골세포 및 골아세포에서는 미약한 염색상을 보였다(Fig. 10).

나. 실험군

1) 견인측 치주조직변화(Table 1)

실험 12시간째에서, 치주인대들은 약간의 무질서함이 관찰되었고(Fig. 3) 혈액유출과 함께 미약한 염증세포 침윤이 관찰되었으나 신생골 형성 및 골 흡수는 거의 없었다.

1일째에는, 치주인대 간격이 약간 넓어지면서 치주인대의 무질서함이 12시간에 비해 증가되었으며 염증세포침윤도 증가하였으나 골흡수및 골형성은 미약하였다. 4일째에는, 1일째에 비해 치주인대 간격이 더욱 넓어지면서 골아세포에 의한 신생골 형성이 출현하였

Table 2. The Expression of EGF in Periodontal Ligament of Control and Experimental Groups

	Pressure side			Tension side		
	Cervical	Middle	Apical	Cervical	Middle	Apical
Control	±	±	±	±	±	±
12H	±	±	±	±	±	±
1D	±	±	±	±	±	±
4D	±	±	±	±	±	±
7D	±	±	+	±	±	+
14D	+	+ - ++	++	++	++	+++

±;rare +;mild ++;moderate +++;severe

으나 치주인대혈관의 충혈 및 혈액유출이 염증세포 침윤과 함께 잔존되었다.

7일째에는, 치주인대 주위의 염증세포 침윤 및 충혈은 4일째와 큰 차이가 없었으나 치주인대의 파열은 4일째보다 감소되었고 골아세포의 활성화는 증가하여 신생골형성이 4일째에 비해 현저히 증가하였다.

14일째에는 치주인대 간격의 확대가 유지되면서 (Fig. 4) 치주인대 섬유배열은 거의 정상에 가까워졌고 (Fig.5), 염증세포 침윤은 거의 없었으나 치조정부위의 혈관 충혈은 여전히 현저하였으며 골아세포의 활성화도가 왕성하여 (Fig.6) 신생골 형성이 가장 많았다 (Fig.7).

2) 압박측 치주조직변화 (Table 1)

교정력을 가한지 12시간째에서는 치주인대 간격이 약간 감소되었고 치조골의 흡수가 약간 관찰되었으며 염증세포 침윤은 경미하였고 초자절화대도 관찰되지 않았다.

1일째에는 치주인대 간격은 12시간과 큰 차이가 없었고 치조골 흡수 및 혈관 충혈 역시 큰 차이가 없었다.

4일째에는 치주인대의 무세포대가 관찰되었고 (Fig.8) 1일째에 비해 염증세포 침윤이 감소되었으나 치조골 가까이 파골세포에 의한 골흡수가 관찰되기 시작하였다 (Fig.9).

7일째에는 치주인대섬유의 무질서한 배열이 유지되면서 그 하방의 치조골은 파골세포에 의한 골흡수가 4일째에 비해 더 많이 진행되었고 치경부와 치근단부위의 혈관증식이 활발하였다.

14일째에는 치주인대 간격이 현저히 감소되었고 치주인대섬유의 재배열이 관찰되고 미약한 염증세포 침윤이 잔존되어 있었으며 치조골 흡수도 많이 진행되었다.

3) 상피성장인자(EGF)의 발현 (Table 2)

교정력을 가한지 12시간째에서 EGF의 발현과 그에 따른 염색도는 압박측과 견인측 간에 차이없이 유사하였는데 치조골 및 골원세포는 미약한 발색을 나타내었고 (Fig.11), 골아세포와 조백악질세포는 미약한 양성을 보였으며 치주인대 내부에서는 미만성의 경미한 양성반응을 보였다.

1일째에는 일부 구강상피에서 염색도가 유극세포층까지 증가되었고 (Fig.12) 압박측과 견인측 간의 차이는 없어 조백악질세포, 전상아질, 조상아세포에서만 경미한 발색을 보였으나 치주인대이나 주위 치조골에서는 음성발색을 보였다 (Fig.13).

4일째와 7일째에도, 대조군과 큰 차이없이, 치주조직에서 경미한 미만성의 양성반응을 보이다가 (Fig. 14), 7일째의 치근단 부위의 치주조직에서만 염색상이 증가되었다.

14일째에서는 이전의 실험군과 달리 발색이 현저히 증가되었는데 치수혈관 내피세포와 치근단 조백악질세포, 전상아질은 물론 치주인대 섬유에서도 중등도의 양성반응을 보였다. 또한 압박측에 비해 견인측에서 더 농염된 염색상을 보였으며 치경부보다 치근단 부위에서 더 많은 발색을 나타냈다 (Fig.15,16).

IV. 총괄 및 고찰

교정력을 가하여 치아를 이동하기 위해서는 파골세포가 출현하고 치주인대의 압박부위 인접부 골을 제거할 수 있어야 하며 골아세포는 또한 신장부위에 새로운 골을 형성하고 압박부위의 흡수된 부위를 개조하여야 된다. 이러한 골반응에 대하여 Frost³⁷⁾는 교정력에 의한 치조골의 반응은 정상적인 골개조 과정에서 관찰되는 소견과 유사한 것으로 생각되고 있어

골개조 과정에서의 세포 활성화는 수 시간 이내에 이루어지며 흡수는 한달간 계속되고 다양한 반전기를 거친 다음에 골형성이 2-3개월간 지속된다고 하였고, Miura등³⁸⁾은 Waldo³⁹⁾의 방법에 의한 치아이동시 압박측에서 12시간에 파골세포가 나타나서 7일간 존속하며, 골흡수는 1-14일까지 지속되고 골침가는 21일부터 시작한다고 하였다. 본 연구에서는 1일에서 부터 골흡수가 관찰되어 14일째에 최고도에 달하였다.

교정력을 받은 압박측 치아의 치주인대에는 Macapanpan등⁴⁰⁾이 초자질화대가 형성된다고 하였으며, Kvam³⁷⁾은 광범위한 초자질화대는 치아이동을 저지시키며 치근흡수를 일어나게 할 수 있다고 주장하였고, Reitan과 Kvam⁴²⁾은 초자질화된 치주인대에서는 교원섬유들이 보이지 않고 주위 간질물질과 합쳐져서 균일하게 나타난다고 하였다. Glickman⁴³⁾은 치주인대에 초자질화대가 나타난다는 것은 치주질환의 진행과정에서 중요한 의미가 있다고 하였다. Reitan 등⁴²⁾도 이런 초자양변성은 백서같은 작은 동물에서는 즉시 그리고 초기 발생한다고 하였으며, 이러한 교정력을 가한 후 압박측 치주인대에 초자양 변성된 부위가 나타나는데, Macapanpan등⁴⁰⁾은 이런 초자양변성의 발생은 교정력을 가한지 6시간이 소요된다고 하였으며, Azuma⁴¹⁾는 6-12시간이 소요된다고 하였으나 본연구에서는 무세포대가 실험 4일째에 관찰되었다. Azuma⁴¹⁾도 압박측 치주인대의 초자양변성된 치주인대 섬유의 재생은 21일 이상 소요되고 치조골의 부분적 재생도 이루어 진다고 하였고, 본 연구에서도 치주인대 섬유의 증식과 염증세포 침윤 감소로 인한 치주인대 재생은 7일째 부터 이루어지기 시작하였으나 14일째에도 완전한 치주인대 섬유의 재생은 관찰되지 않아 보다 충분한 치주인대의 재생을 관찰하기 위해서는 장기적인 관찰이 필요하다고 사료된다.

교정력의 크기와 기간에 있어서 Storey¹⁴⁾에 의하면 견인측에는 혈액순환이 증가하여 골아세포의 수와 크기가 증가하고 새로운 골조직이 형성되나, 지나치게 강한 힘은 골형성을 억제하거나 지연시킬 수 있다고 하였다. Aisenberg⁴⁴⁾은 강한 힘을 가하면 힘의 방향으로 골소주가 형성되고, 약한 힘의 경우에는 치조골 전반에 걸쳐 신생골이 형성되므로 고정기간이 단축된다고 하였으며, Ackerman과 Cohen⁴⁵⁾은 신생골 형성은 힘의 크기보다 기간에 더 큰 관계가 있다고 하였다. 본 연구에서 75g의 비교적 약한 단기적 힘을 이용하였으므로, 실험군에서의 견인측과 압박측의 치

주조직 변화에서 극적인 골흡수 소견이나 조직 파괴의 양상, 심한 초자양 변성, 왕성한 골침가 반응 등은 볼 수 없었으나 실험 14일째에는 많은 신생골 형성을 보였다.

본 연구에서 사용된 LSAB(DAKO,USA) 면역조직화학적 염색법은 biotinylated 된 이차항체가 몇 개의 alkaline phosphatase-conjugated streptavidin molecules 와 반응하는 정제된 avidin-biotin 기술을 사용하는 방법으로 다른 immunoperoxidase 방법과는 달리 endogenous peroxidase의 활성화에 영향을 받지 않아 사람의 골수나 비장같은 중성구와 호산구가 많이 침윤된 조직에 특히 염색가치가 있으며 기존의 ABC 방법보다 민감성(sensitivity)이 뛰어나고 한시간 안에 많은 표본처리가 가능하며 Giorno⁵¹⁾에 따르면 민감성이 8배 정도 증가한다고 한다.

구강내 EGF의 친화성은 Bergler등²⁹⁾이 구강상피, 섬유아세포, 골아세포에 큰 친화성을 나타낸다고 하였는데, 본 연구결과 역시 전 치주조직에 걸쳐 EGF의 분포가 미만성의 양성반응을 보였고 특히 치수 및 치주인대의 혈관에 강한 양성발색반응을 보여 혈류를 통해 분비되는 EGF가 치주조직 전반에 걸쳐 존재할 수 있고 특히 EGF에 친화성을 보이는 치주상피에도 양성반응을 보였으나 파골세포, 골아세포, 골원세포 등 골 재형성에 관여하는 세포에도 미약하나마 양성반응을 보였었다.

골세포에 대한 EGF의 작용에 있어서는 Canalis와 Raisz³⁴⁾에 의하면 골내의 DNA합성을 촉진하고 교원 섬유 합성을 억제한다고 하였고, Kumergawa등⁴⁷⁾은 EGF가 골아세포를 탈분화시키는 작용을 하여 다각형의 세포형태를 방추형으로 형태 변환을 시키나, 이렇게 변환된 세포도 석회화 능력을 역시 지니고 있어, EGF는 성숙된 골세포의 분화는 억제하면서 미분화 세포의 증식을 촉진시키는 작용으로 골 재형성에 관여하리라 추측하였다. 또한 실험군에서 7일까지 견인측과 압박측의 EGF에 대한 염색도 차이가 현저할 정도로 나타나지 않은 것은 EGF자체가 골흡수 또는 섬유아세포의 세포분열 자체를 촉진시키는 것이 아니라 물리적 환경의 변화에 대한 치주조직의 항상성 유지 과정에서 그 작용이 조절되어 발휘되리라는 것을 짐작케 한다.

본 연구에서 교정력을 가한지 14일부터는 EGF의 염색도가 현저히 증가되었으며, 압박측보다 견인측이 더 많은 발색이 나타났는데, 교정력을 가한지 특정기

간에서 부터 EGF의 발현이 치주인대내에서 뚜렷해 지는 것을 시사하고 있고 견인축이 더 많이 염색된것 은 증가된 세포활성에 따라 EGF에 대한 친화력 증가 및 EGF 작용의 증가가 있었기 때문으로 사료된다. 그러나 교정력의 적용에 따른 조직의 적응과정의 일환으로, 압박측에서도 골흡수 기전을 통한 골 재형성에 EGF가 어떤 역할을 담당할 것으로 추측할 수 있다.

세포내 EGF가 존재함은 한편으로 세포분열이 왕성함을 의미한다고 할 수 있으며 Robinson등⁴⁸⁾은 화학적으로 변형시킨 배양세포나 영양부족으로 G₁ phase 에 세포성장이 변형된 세포에서보다, 분열이 왕성하며 변형되지 않은 세포에서 EGF의 결합이 더 크다고 하였고 화학적으로 변형된 세포에서 세포분열이 왕성해도 EGF의 결합은 증가되지 않음을 보고 하였다. 따라서 본 연구에서, 치근단에서 보다 많은 EGF의 발현이 나타났던 점은 치근단쪽의 세포분열이 치경부쪽보다 계속되는 치아발육으로 인해 더 크기때문에 세포분열이 왕성한 결과라고 사료된다.

EGF가 효과를 나타내는 기전은 아직 알려지지 않았으나, 수용체의 특이한 작용^{49,50)}으로 인산화에 어떤 역할을 담당하고 세포내 수준에서는 조포체의 분화 발달을 촉진⁵¹⁾시키며 세포표면에서는 EGF에 대한 감수성을 조절하는 어떤 기전^{49,52)}이 일어나리라 여겨지고 있다. 특수한 세포에 대한 EGF의 작용에 관한 여러 연구를 통해 EGF의 작용기전을 좀 더 많이 알게 되었는데, 종양세포에 있어서는 감수성 조절의 상실로 말미암아 수용체의 급격한 수적 증가가 야기되어⁵³⁾ 세포분열이 증가되어 병적인 소견을 나타나게 된다고 하였다^{27,54)}.

섬유아세포에 대한 EGF의 연구에서, 생리적인 농도에서의 EGF가 세포분열 활성을 10-20배 증가시키고, EGF수용체가 섬유아세포 표면에 존재한다고 Carpenter등³⁰⁾이 보고한 바 있으나, EGF는 낮은 농도에서도 강력한 세포분열 촉진 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

골아세포류의 세포 배양연구⁵⁵⁾에서, EGF는 골아세포의 합성능력에 작용해 제 I형 교원섬유 합성은 억제시키고, 보다 더 미분화된 형태인 제 III형 교원섬유의 증가를 초래해 간접적으로 골형성 억제에 관여한다고 Hiramatsu등⁵⁶⁾이 밝혔으며, 또한 Raisz과 Simmons⁵⁷⁾에 의하면 EGF가 파골세포 수를 증가시켜 직접적으로 골흡수에 관여하기도 한다고 하였다.

EGF와 염증과의 관계에서, Irwin등⁴⁹⁾이 EGF염색 및 EGF수용체 염색실험에서 정상과 염증 소견이 있는 치은조직을 비교해 본 결과 염증 소견이 있는 치은 조직의 상피 및 lamina propria에 진하지는 않지만 EGF염색도가 증가됨으로써 EGF가 염증작용 및 치유작용을 하리라는 것을 시사하였다.

세포내 EGF의 발현의 측정에 있어, Carpenter등⁵⁸⁾이 시행한 방사선 동위원소(¹²⁵I)를 이용한 방법이나 Ullrich등⁵⁹⁾의 Blotting technique을 이용하여 비교적 주관적인 오차를 줄일 수 있다. 또한 파라핀 절편에서의 면역조직화학적 염색을 통해 양성세포수를 산정하여 그 백분율에 의해 발현강도를 비교한 보고⁶⁰⁾가 있었으나 이는 양성세포수를 산정할때 조직의 두께와 산정자에 의한 주관적 오차가 많을 것으로 생각되며 일차항체의 희석 비율을 이용한 양성반응의 평가를 할 수 있으나 일차항체의 희석에 따른 시약의 소모가 많아서 비경제적이라고 생각된다. 따라서 EGF에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 양성반응의 차이를 비교할 때 발생할 수 있는 오차를 줄이기 위해 영상 분석장치의 응용이 필요하리라 보인다. 즉, 검경시 양성반응으로 관찰되는 천연색상을 흑백상으로 변환시킨 후 양성반응의 강도에 따라 다르게 염색되는 흑백상의 grey level을 측정하여 객관적인 성적을 얻을 수 있으리라 사료된다.

교정력에 의한 조직반응을 견인축, 압박축의 골침가 및 골흡수 기전에 따르는 일련의 반복적인 과정으로 보는 고정적인 시각에서 벗어나 보다 더 생리적인 범위내에서의 생체의 항상성 유지를 위한 반응으로 시각을 넓혀 보다 많은 연구가 필요하리라 본다. 또한 조직호르몬은 그 작용이 국소적임을 고려할 때, 교정에 의한 구강조직의 변화도 역시 국소적이므로 조직호르몬의 분비 및 작용도 이에 뒤따르리라는 것을 예측할 수 있으나, EGF는 수 많은 조직호르몬 중의 일종일 뿐으로, 알려지지 않은 다른 조직 호르몬의 역할에 대해서도 역시 규명되어야 할 것이다.

한편, 각 세포들에 대한 특수한 EGF의 효과는 대부분 세포배양을 통한 시험관내 실험의 결과가 대부분이고 생체내에서의 작용에 관해서는 거의 유추 해석한 것이 많아 앞으로도 많은 연구가 요구되는 분야라 여겨지며, 조직호르몬과 관련시켜 치조골의 변화, 치주인대 섬유 변화, 각 세포들의 활성도 변화등의 보다 진전된 연구가 이루어져야 하리라 보인다.

V. 결 론

교정력에 의한 치아이동시 치주조직의 조직변화를 알아보고 성장인자중의 하나인 Epidemal Growth Factor (EGF)의 시간 경과에 따른 발현정도 및 분포 변화를 알아 보고자, Sprague-Dawley계 백서 23마리를 대조군(3마리)과 실험군(20마리)으로 나누었으며, 실험군은 교정력(75g)을 가한 후 12시간, 1일, 4일, 7일, 14일이 경과한 후 각각 4마리씩 희생시켜, EGF의 발현 분포와 조직학적 변화를 면역조직화학적 및 조직병리학적으로 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 교정력을 가한 후 14일까지, 견인측의 치주인대 섬유는 신장되었고, 압박측의 치주인대 섬유는 압축되었으며 치주인대섬유 배열의 완전회복은 일어나지 않았다.
2. 대조군의 EGF 발현은 구강상피, 전상아질, 치수와 치주인대내의 혈관에서 진하게 발현되었으나, 파골세포 및 골아세포에서는 미약한 염색상을 보였다.
3. 교정력을 가한지 12시간, 1일, 4일, 7일째 실험군의 치주조직에서의 EGF의 발현은 견인측과 압박측의 차이가 없이, 경미한 미만성의 양성반응을 보였다.
4. 교정력을 가한지 14일째 치주조직에서 EGF의 발현이 현저히 증가되었으며, 압박측보다 견인측이 더 많이 발현되었으며, 치경부 쪽보다 치근단 쪽에서 더 많았다.

참 고 문 헌

1. Sandstedt, C. : Einige Beitrage zur Theorie der Zahnregulierung, Nordisk Tandlakare Tidsskrift, 5 : 236-256, 1904.
2. Schwartz, A. M. : Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. Int. J. Orthod., 18 : 331-352, 1931.
3. Oppenheim, A. : Biologic orthodontic therapy and reality. Angle Orthod., 6 : 5-38, 1936.
4. Storey, E. : Bone changes associated with tooth movement, Aust. J. Dent., 59 : 147-161, 1955.
5. Reitan, K. : Tissue behavior during orthodontic tooth movement, Am. J. Orthod., 46 : 881-900, 1960.
6. Zaki, A. E., Huysen, G. V. : Histology of the periodontium following tooth movement, J. Dent. Res., 42 : 1373-1379, 1963.
7. Singer, J. : A histologic study of the effect of fluoride on

- tooth movement in the rat, Am. J. Orthod., 53 : 296-308, 1967.
8. Kourmas, H. : Effects of pressure on the formation of collagen in the periodontal ligament, Am. J. Orthod., 56 : 604-612, 1969.
9. Buck, O. L. : Histologic evidence for lipid during human tooth movement Am. J. Orthod. 64 : 619-624, 1973.
10. 이인환 : 백서의 실험적 치아이동에 따른 치주조직의 조직학적인 연구, 대치교지, 19 : 141-145, 1981.
11. 임진환 : 실험적 치아이동시 나타나는 백서 치주조직의 변화에 대한 조직학적 및 조직화학적연구, 대치교지, 6 : 33-36, 1976.
12. Storey, E., Smith, R. : Force in orthodontics & its relation to tooth movement, Aust. J. Dent. 56 : 11-18, 1952.
13. Storey, E., Smith, R. : The importance of force in orthodontics. the design of cuspid retraction springs, Aust. J. Dent. 56 : 291-304, 1952.
14. Storey, E. : The nature of tooth movement, Am. J. Orthod., 63 : 292-314, 1973.
15. Storey, E. : Bone changes associated with tooth movement, Aust. J. Dent., 57 : 57-64, 1953.
16. Hixon, E. H., Atikian, H., Callow, G. E., McDonald, H. W., Tacy, R. J. : Optimal force, difference force, and anchorage, Am. J. Orthod., 55 : 437-457, 1969.
17. Fitzgerald, P. J., Eidinoff, M. L., Knoll, J. E., Simmel, E. B. : Science, N. Y., 114 : 494, 1951.
18. 유기환, 김상철, 국윤아 : 백서의 전치 이동시 초기변화에 관한 조직학적 및 자기방사법적 연구, 대치교지, 23 : 199-216, 1993.
19. Davidovitch, Z., Montgomery, P. C., Eckerdal, D., Gustafson, G. T. : Cellular localization of cyclic AMP in periodontal tissues during experimental tooth movement in cats. Calif. Tissue Res., 19 : 317-329, 1976.
20. Norton, L. A., Rodan, G. A., Bourret, L. A. : Epiphyseal cartilage cAMP changes produced by electrical and mechanical perturbations, J. Clin. Orthop., 124 : 59-68, 1977.
21. 김영복, 이종훈, 양원식 : 외인성전류가 고양이 치조골의 cyclic nucleotides에 미치는 영향에 관한 연구, 대치교지, 14 : 187-202, 1984.
22. Cohen, S. : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating in the new born animal. J. Bio. Chem. 237 : 1555, 1962.
23. Terranova, V. P. and Wikessjo, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factor as mediators of functions of cells of the periodontium. J. Periodontol, 6 : 371-380, 1987.
24. Polson, A. M. : The root surface and regeneration ; present therapeutic limitations and future biologic potentials. J. Clin. Periodontol, 13 : 995-999, 1986.

25. Carpenter, G., Cohen, S. : Epidermal growth factor & the proliferation of human fibroblasts, *J. Cell Physiol.*, 88 : 227-237, 1976.
26. Carpenter, G., Cohen, S. : Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.*, 48 : 193-216, 1979.
27. McKee, M. D., Martineau, B and Warshawsky, H : Penetration of various molecular weight proteins into the enamel organ and enamel of the rat incisor, *Archs Oral Biol.* 31, 287-296.
28. Wang, S. L., WuWang, C. Y., Miles, M., Liu, J., Slomiany, A. Slomiany, B. L. : Identification of EGF receptor in human buccal mucosa. *Arch. Oral Biol.*, 35 : 823-828, 1990.
29. Bergler, W., Bier, H., Ganzer, U. : The expression of EGF receptors in the oral mucosa of patients with oral cancer. *Arch. Otorhinolaryngol.* 246 : 121-125, 1989.
30. Carpenter, G. King Jr, L., Cohen, S. : EGF stimulates phosphorylation in membrane preparation in vitro. *Nature* 276 : 409-410, 1978.
31. Steidler, N. E., Reade, P. C. : Epidermal growth factor and proliferation of odontogenic cells in culture. *J. Dent. Res.*, 60 : 1978-1982, 1981.
32. Liang, R. F., Nishimura, S., et al. : Effect of transforming growth factor- β and EGF on clonal rat pulp cells. *Arch. Oral Biol.* 35 : 7-11, 1990.
33. Thesleff, I. : Epithelial cell rests of malassez bind EGF intensely. *J. Perio. Res.* 22 : 419-421, 1987.
34. Canalis, E., Raisz, L. G. : Effect of EGF on bone formation in vitro, *Endocrinology*, 104 : 862-869, 1979.
35. 우건희, 신형식 : Epidermal Growth Factor가 림프구 기능 조절 작용에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, *대한치주과 학회지*, 21 : 85-100, 1991.
36. Southard, K. S., Forbes, D. P. : The effects of force magnitude on a sutural model : A quantitative approach, *Am. J. Orthod.*, 93 : 460-466, 1988.
37. Frost, H. M. : Tetracycline based histological analysis of bone remodeling, *Calcif. Tissue Res.*, 3 : 211-237, 1969.
38. Miura, F., Kurilhara, S. : Alveolar bone reaction caused by orthodontic stimulus, *Dent. Outlook*, 61 : 1231-1242, 1983.
39. Waldo, C. M. : Method for the study of tissue response to tooth movement, *J. Dent. Res.*, 32 : 690-691, 1953.
40. Macapanpan, L. C., Weinmann, J. P., Brodie, A. G. : Early tissue changes following tooth movement in rats, *Angle Orthod.*, 24 : 79-95, 1954.
41. Azuma, M. : Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement, *Bull. Tokyo Med. Dent. Uni.*, 17 : 149-178, 1970.
42. Reitan, K., Kvam, E. : Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement, *Angle Orthod.*, 41 : 1-14, 1971.
43. Glickman, I. : *Clinical periodontology*, W. B. Saunders Co., pp. 332, 1972.
44. Aisenberg, M. S. : The tissue and change involved in orthodontic tooth movement, *Am. J. Orthod.*, 34 : 854-859, 1948.
45. Ackerman, J. L., Cohen, M. I. : The effects of quantified pressures on bones, *Am. J. Orthod.*, 52 : 34-46, 1966
46. Giorno R. : A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diag. Immunol.*, 2 : 161-166, 1984
47. Kumegawa, K., Hiramatsu, M. : Effects of EGF on osteoblastic cells in vitro. *Calci. tissue. Int.* 35, 542-548, 1983.
48. Robinson, R. A., Branum, E. L., Volkenant, M. E., Moses, H. L., : Cell cycle variation in 125 I-labeled EGF binding in chemically transformed cells. *Cancer Res* 42 ; 2633-2638, 1982.
49. Irwin, C. R., Schor, S. L., Ferguson, M. W. J. : Expression of EGF receptors on epithelial and stromal cells of normal and inflamed gingiva. *J. Periodont. Res.* 26 : 388-394, 1991.
50. Yamada, K., Iwai, K., Okada, Y., Mori, M. : Immunohistochemical expression of EGFR in salivary gland tumors. *Virchows. Archiv. A. Pathol. Anat.*, 415 : 523-531, 1989.
51. Beaulieu, J. F., Calvert, R. : The effect of EGF on the differentiation of the rough endoplasmic reticulum in fetal mouse small intestine in organ culture. *J. Histochem. and cytol.* 29 : 6, . 765-770, 1981.
52. Savion, N., Vlodaysk, I., Gospodarowicz, D. : Role of the degradation process in the mitogenic effect of epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77 : 1466-1470, 1980.
53. Ito, M., Yoshida, K., et al. : Expression of several growth factors and their receptor genes in human colon carcinomas. *Virchows. Archiv. B. Cell. Pathol.* 59 : 173-178, 1990.
54. Gullick, W. J., Hughes, C. M., et al. : Immunohistochemical detection of the EGFR in paraffin embedded human tissues, *J. Pathol.*, 164 : 285-289, 1991.
55. Ng, K. W., Patridge, N. C., et al. : Stimulation of DNA synthesis by EGF in osteoblastic like cells. *Calci. Tissue. Int.*, 35 : 624-628, 1983.
56. Hiramatus, M., Kumegawa, M., et al. : Effect of EGF on collagen synthesis in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria, *Endocrinology*, 111 : 1810-1816, 1982.
57. Raisz, L. G., Simmons, H. A., et al. : Direct stimulation of bone resorption by EGF, *Endocrinology*, 107 : 270-273, 1980.
58. Carpenter, G., Lembach, K. J., Morrison, M. M., Cohen

- S., : Characterization of the binding of ^{125}I -labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 250 ; 4297-4304, 1975.
59. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, J. J., : Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells, *Nature*, 309 ; 418-425, 1984.
60. Cerny, T., Barnes, D. M., Halsleton, P., Barber, P. V. : Expression of epidermal growth factor in human lung tumors. *Br J Cancer* 54 ; 265-269, 1986.

-ABSTRACT-

AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON THE EXPRESSION OF GROWTH FACTOR IN PERIODONTAL TISSUE DURING THE EXPERIMENTAL MOVEMENT OF RAT INCISORS

Joon-Hyeong Lee, D.D.S., M.S.D. · Sang-Cheol Kim, D.D.S., M.S.D., Ph. D.
· Yoon-A Kook, D.D.S., M.S.D.

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Wonkwang University

This study was designed to evaluate the expression of growth factor in periodontal tissue during the experimental movement of rat incisors by LSAB(Labelled streptavidine Biotin) immunohistochemical staining for EGF(Epidermal growth factor). 23 Sprague-Dawley rats were divided into a control group(3rats) and experimental groups(20rats), where a force(75g) from helical springs across the maxillary incisors was applied. Experimental groups were sacrificed at 12 hours, 1, 4, 7 and 14 days, after force application, respectively. And Tissue slides of control and experimental groups were studied immunohistochemically and histologically.

The results were as follows :

1. In 14days after force application, periodontal fibers were stretched on the tension side, and compressed in pressure side of all experimental groups, and the arrangement of periodontal fibers was not recovered yet.
2. The degree of EGF expression in control group was strongly positive in the oral epithelium, predentin, capillaries in pulp and periodontal spaces. But osteoblasts and osteoclasts were stained mildly positive.
3. EGF expression was mild and diffuse in 12 hours, 1, 4 and 7 days of experimental groups and was not significantly different between the tension and pressure sides.
4. The degree of EGF expression in the 14-day experimental group was higher than any other group. And the tension side showed a more positive EGF expression than the pressure side. The apical area revealed a more positive EGF expression than the cervical area.

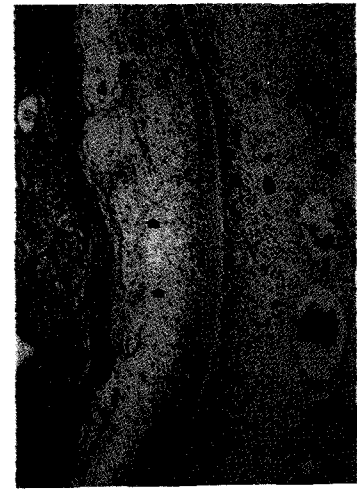
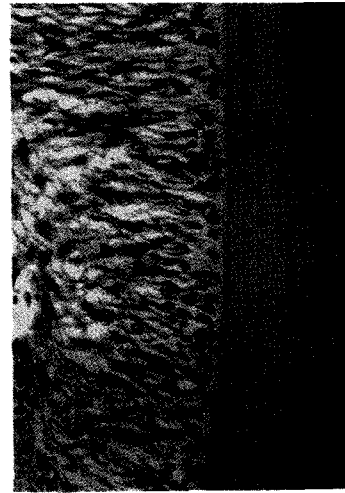
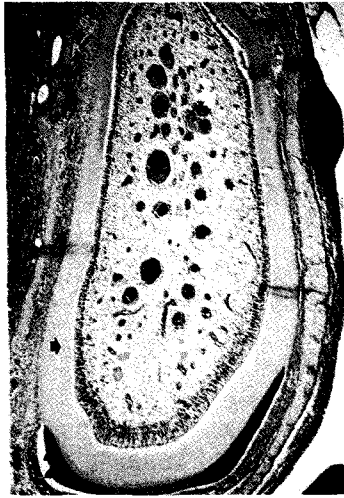
KOREA. J. ORTHOD. 1995 ; 25 : 33-42

※ **Key words** : Tooth movement, Orthodontic force, EGF

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1.** The helical spring placed on the maxillary incisors of rat.
- Fig. 2.** Microphotography of periodontium in control tissue. Periodontal Ligament, Cementum, Alveolar Bone. (H & E, X 40)
- Fig. 3.** Microphotography of 12-hour tissue shows tearing of periodontal ligament at tension side. (PAS, X 40)
- Fig. 4.** Microphotography in 14-day tissue shows a marked widening of periodontal ligament space at tension side. (H & E, X 40)
- Fig. 5.** Microphotography in 14-day tissue shows recovering of the regularity of periodontal ligament at tension side. (H & E, X 100)
- Fig. 6.** Microphotography in 14-day tissue discloses active osteoblasts at tension side. (H & E, X 200)
- Fig. 7.** Microphotography in 14-day tissue shows immature bone at tension side of alveolar bone. (Masson's trichrome, X 100)
- Fig. 8.** Microphotography in 4-day tissue shows acellular zones (cell free zones at periodontal ligament of pressure side. (H & E, X 100)
- Fig. 9.** Microphotography in 4-day tissue reveals bone resorption by osteoclasts at pressure side. (H & E, X 100)
- Fig. 10.** Microphotography of control tissue shows mild positive distribution of EGF all around the periodontal area. (Immunostain of EGF, X 100)
- Fig. 11.** Microphotography in 12-hour tissue shows negative expression of EGF at tension side of periodontal ligament. (Immunostain of EGF, X 100)
- Fig. 12.** Microphotography in 1-day tissue shows strongly positive expression of EGF at oral epithelium. (Immunostain of EGF, X 100)
- Fig. 13.** Microphotography in 1-day tissue shows negative expression of EGF at pressure side of periodontal ligament. (Immunostain of EGF, X 100)
- Fig. 14.** Microphotography in 7-day tissue shows negative expression of EGF at tension side of periodontal ligament, but positive expression of EGF at ostoblasts. (Immunostain of EGF, X 100)
- Fig. 15.** Microphotography in 14-day tissue shows more positive expression of EGF in tension side than in pressure side, and more in apical area than in cervical area. (Immunostain of EGF, X 40)
- Fig. 16.** High power magnification of tension side at Fig. 15. Positive expression of EGF in periodontal fibers were seen. (Immunostain of EGF, X 100)

논문 사진부도 ①



논문 사진부도 ②

