

백서 정중구개붕합 확대후의 CGRP 면역반응 신경섬유의 변화

김 보 경¹⁾ · 박 국 필²⁾ · 경 희 문³⁾ · 권 오 원⁴⁾ · 성 재 현⁵⁾

측방확대장치에 의한 정중구개붕합부의 확대시 교정력은 구개부의 신경요소들에 변화를 일으키면서 동통을 유발하게 되고 구개붕합부가 확대되고 그것이 유지되는 동안에 기계적 자극에 의한 구개부신경섬유의 반응성에 변화를 일으킬 것으로 생각된다.

본 연구에서는 백서 정중구개붕합부의 CGRP 면역반응 신경섬유의 교정력 적용시간에 따른 형태학적인 반응성, 밀도, 분포변화등을 관찰하고 그와 연관된 CGRP의 기능을 알아보고자 250gm내외의 Sprague-Dawley 웅성백서 상악 전치에 200gm의 치아이개력이 가해지도록 활성화시킨 helical spring을 삽입하여 정상대조군과 장치 장착후 경과시간에 따라 1일, 4일, 7일, 14일 경과군으로 나누어 정중구개붕합부를 확대후 희생시켜 면역조직화학법으로 염색하여 관찰하였다.

- 대조군에서 정중구개 붕합부 결합조직의 CGRP 면역양성 신경섬유는 거의 관찰되지 않았다.
- 1일군에서는 대조군에 비해 CGRP 면역반응 신경섬유가 현저한 증가를 보였으며 주로 혈관 주위에 염주알 모양의 가는 신경섬유가 관찰되었다.
- 4일군에서는 CGRP 면역반응 신경섬유가 대조군에 비해서는 현저한 증가를 보였으나 1일군에 비해서는 크게 증가하지 않았으며 혈관의 크기가 훨씬 확장되어 관찰되었다.
- 7일군에서는 특징적으로 조골양세포가 새로이 형성된 골변연을 따라 줄지어 배열되는 독특한 양상이 관찰되었고 신경섬유의 수는 4일군에 비하여 감소하고 혈관의 직경도 감소되었다.
- 14일군에서는 CGRP 면역반응 신경섬유가 7일군과 유사한 분포를 보였으며 확대에 의한 골변연의 불규칙성도 대체로 감소되었다.

CGRP 면역반응 신경섬유는 정중구개붕합의 확대시 초기에 일어나는 신경원성 염증반응에 주로 관련되어 증식되는 것으로 생각된다.

(주요단어 : 정중구개붕합, 확대, CGRP 면역반응 신경섬유, 염증반응)

I. 서 론

측방확대장치에 의한 정중구개붕합부의 확대는

1860년 Angell에 의해 상악 견치의 공간확보를 위해 최초로 시도된 이후 상악치열궁의 협착을 동반하는 부정교합자, 구개파열환자, 비강이 협소하여 호흡에 장애를 받는 환자들에게서 많이 시도되어 왔다.

정중구개붕합의 확대에 대하여는 많은 연구가 이루어졌는데 정중구개붕합의 확대후에 구개변연을 따라 새로운 골이 형성되는 상악골의 변화^{9,11)}, 정중구개붕합의 확대시에 동반하여 일어나는 주변붕합의

1) 경북대학교 치과대학 교정학교실, 대학원생

2) 경북대학교 치과대학 해부학교실, 조교

3) 경북대학교 치과대학 교정학교실, 부교수

4) 경북대학교 치과대학 교정학교실, 교수

5) 경북대학교 치과대학 교정학교실, 교수

확대로 인한 두개골과 안면골격에서의 변화^{25,39,41)}, 두 부방사선 계측사진을 이용한 상악골 확대후의 부채꼴 모양의 상악골의 위치변화⁵⁾, 정중구개융합의 확대 후에 나타나는 비융합 확대로 인한 비강의 폭경증가²¹⁾ 등에 관한 보고들이 있고, Derichsweiler¹⁰⁾, Cleall⁶⁾, Gardner와 Kronman¹¹⁾, Murray와 Cleall²³⁾이 원숭이에서, Debbane⁹⁾이 고양이에서, Ten Cate³⁶⁾이 쥐의 구개융합을 확대시켜 관찰한 결과 확대된 융합부에서 초기에 충혈이 있는 후 구개돌기의 변연부에서부터 섬유속을 따라 새로운 골을 형성하는 조골세포의 활성이 이루어짐을 공통적으로 관찰하였다.

한편, CGRP는 신경조직에서 calcitonin mRNA를 분석할 때 분자생물학적인 방법을 적용시켜 발견한 37개의 아미노산으로 구성된 neuropeptide이다¹⁾. 이는 면역조직화학적 연구를 통해 중추신경계와 말초신경계에 아주 널리 분포하고 있고 치과 영역의 여러 조직에서도 CGRP 면역반응 신경섬유들이 많이 발견되었으며 기계적 자극에 의해 말초조직에 분비되어 염증반응¹²⁾과 골개조¹⁵⁾, 면역체계의 조절²⁶⁾, 조직치유^{16,17)} 등의 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

치아이동시 교정력은 치주인대에 있는 신경섬유들에 변화를 일으키고 이들에 의해 동통등의 염증반응과 골개조, 치아이동등의 반응성 변화가 일어난다. 치아이동과 교정력에 따른 치주인대에서의 CGRP변화에 대해서는 Kvinnsland와 Kvinnsland²⁰⁾가 백서를 대상으로 상악 제1대구치에 교정력을 가하여 치주인대내의 CGRP 면역반응 신경섬유의 형태, 밀도, 염색강도등의 변화를 관찰하였고, Saito³²⁾은 Wistar rat에 Waldo법으로 탄성고무를 삽입하여 관찰한 실험에서 혈관주위의 CGRP 면역반응성이 증가하였다고 보고하였다. Davidovitch⁷⁾도 고양이에 후방치체이동의 힘을 가하여 대조측과 실험측의 치주인대 세포의 CGRP 면역반응성을 시간경과에 따라 비교, 관찰하였고, 성³⁸⁾은 백서 상악 대구치에 교정력을 가한 실험에서 시간경과에 따른 치주인대내 CGRP 면역반응 신경섬유의 증감을 보고하였다.

정중구개융합부의 확대시 교정력은 구개부의 신경요소들에 변화를 일으키면서 동통을 유발하게 된다. 비록 신경요소들이 확대교정력에 의해 영향을 받는 다지만 구개융합부가 확대되고 그것이 유지되는 동안에 기계적 자극에 의한 구개부 신경섬유의 반응성 변화에 대한 보고는 거의 없다.

따라서, 본 실험의 목적은 백서 정중구개융합부를 실험적으로 확대시켜 융합부에서의 CGRP 면역반응

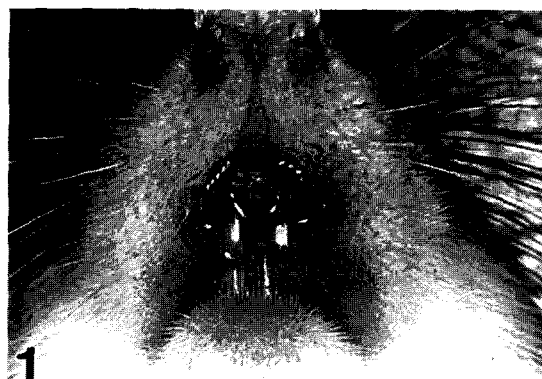


Fig. 1. Teeth separated by helical spring between maxillary anterior incisors

신경섬유의 형태학적인 반응성, 밀도, 분포변화등을 관찰하고 그와 연관된 CGRP의 기능을 알아보고자 함이다.

II. 재료 및 방법

실험동물

실험동물로는 250gm내외의 Sprague-Dawley 웅성 백서를 정상대조군과 장치 장착후 경과시간에 따라 1일, 4일, 7일, 14일 경과군으로 나누어 각 군에 4마리씩을 배분하여 실험하였다.

실험방법

1. 확대 스프링장착 (Fig. 1)

구개확대를 위한 교정장치로서 .016" Elgiloy선재 (RMO Inc., U.S.A.)로 helical spring을 제작하였다. 마취제로 Nembutal (20mg/kg)과 Urethane (500mg/kg)을 사용하여 복강내로 주입하여 마취시킨 뒤 상악 양측 중절치에 구멍을 뚫고 결찰선을 삽입한 후 200gm의 치아이개력이 가해지도록 활성화시킨 helical spring을 결찰함으로써 고정되게 한 다음 양측중절치를 이개시켜 정중구개융합부에 확대력이 가해지도록하여 해당기간동안 유지시켰다. 하악 절치는 상악 절치의 마모와 장치의 손상을 피하기 위하여 삭제하였다.

2. 면역조직화학 염색 및 검정

각 실험동물은 치사량의 2% sodium pentobarbital



Fig. 2. Frontal section of control group. Midpalatal suture tissue is seen between nasal cavity and vessels in it. CGRP-IR fibers are scarcely observed.

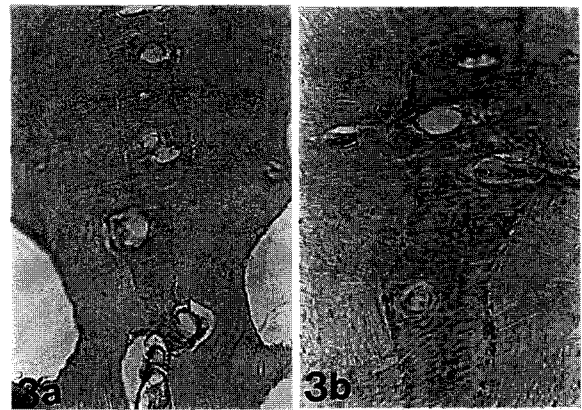


Fig. 3. At 1 day group, midpalatal suture is expanded. CGRP-IR fibers with bead-like appearance are observed abundantly around vessels. The diameter of vessels became large compared with the control group.

을 복강내로 주입하여 희생시킨후 즉시 생리 식염수 (0.85% NaCl) 및 4% paraformaldehyde (0.1M PB, PH 7.4)로 심장을 통하여 관류고정한 후 정중구개봉합부위를 채취하였다.

1일간 4% paraformaldehyde에 후고정시킨다음 Kristensen용액으로 약 3일간 탈회하고 24시간동안 30% sucrose용액에 침적시킨후 냉동절편기로 시상면에 수직되도록 30 μ m두께로 절단하여 slide glass에 올려 1일간 건조시켰다.

건조된 각 절편을 흡윤용기에서 0.1M, phosphate buffered saline(PBS)으로 10분간 2회 세척한 후 다시 0.05M PBS로 10분간 3회 세척하고 내인성 과산화 효소를 제거하기 위하여 0.5% H₂O₂로 30분간 반응시킨 후 0.05M PBS로 10분간 3회 세척하였다. 비특이적 반응을 억제하기 위하여 4% normal goat serum (NGS)으로 2시간동안 반응시켰다. 0.3% triton X-100이 함유된 0.05M PBS에 2400배 희석한 일차항체(Rabbit polyclonal CGRP antiserum(Amersham international plc, Amersham, U.K.)용액내에서 2시간동안 실온에서 반응시킨후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다.

다음 날 0.3% triton X-100이 함유된 0.05M PBS로 10분씩 3회 세척하고 200배 희석한 Rabbit IgG (Vector Lab. Inc., U.S.A.)로 2시간 실온에서 반응시킨후 0.3% triton X-100이 포함된 0.05M PBS로 10분씩 3회 세척하였고 항원항체반응을 가시화하기 위하여 abidin-biotin-peroxidase complex(Vectastain ABC

kit, Vector Lab. Inc., U.S.A.)로 실온에서 2시간동안 반응시켰다.

그리고, 0.3% triton X-100을 함유한 0.05M PBS로 10분씩 2회 세척한 후 다시 0.05M PBS로 10분씩 2회 세척하고 0.05%의 3,3'-diaminobenzidine (DAB)과 0.01% H₂O₂가 포함된 0.05M PBS를 적용하여 발색반응을 시행한 후 실온에서 24시간정도 말린다음 hematoxylin으로 대조염색후 mounting하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또, 면역반응에 대한 대조군으로서 일차항체 대신 0.05M PBS를 사용하여 아무런 반응이 나타나지 않음을 확인하였다.

III. 성 적

대조군 (Fig. 2a, 2b)

백서의 정중구개봉합부는 비강사이에서 좌우상악 골을 연결하는 50-80 μ m정도의 결합조직이 가교(bridge)를 이루고 있고 하방으로 구개상피와 연결되어 있다. 봉합부 결합조직을 형성하는 골변연은 대체로 평행하였고 조직내에는 많은 혈관들이 관찰되었다.

CGRP 면역양성 신경섬유는 봉합부 결합조직에서 거의 관찰되지 않았고 혈관주위에서도 거의 나타나지 않았다.

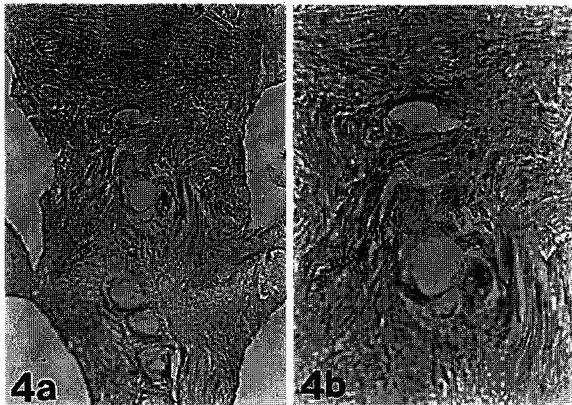


Fig. 4. At 4 days group, CGRP-IR fibers with bead like appearance are gathered around the vessels. Cells are arranged in bone margin.

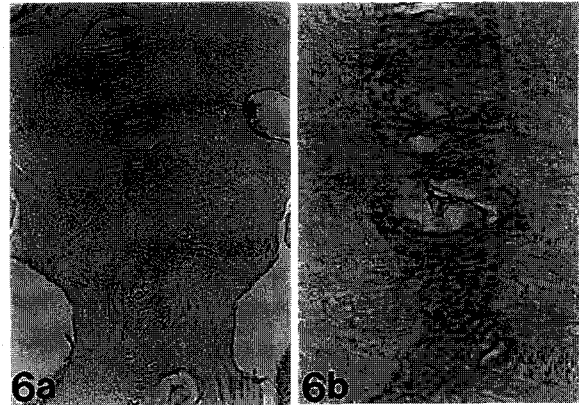


Fig. 6. At 14 days group, especial cell arrangement and irregularity of bone margin are reduced. CGRP-IR fibers around the vessels are similar to those of 7 days group.

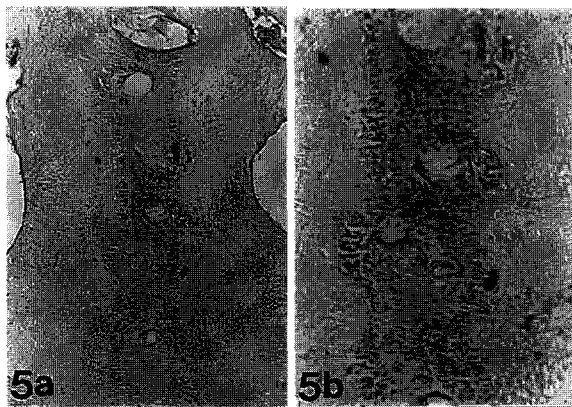


Fig. 5. At 7 days group, Especially, cells arranged along the bone margin are seen. The diameter of vessels is reduced. CGRP-IR fibers are more decreased in number than 4 days group and are also seen around the vessels.

1일군 (Fig. 3a, 3b)

구개붕합부는 100-150 μ m로 대조군에 비해 2배정도의 확대가 일어났으며 약간붕합부의 섬유배열도 견인력이 가해진 방향과 평행하게 배열되는 양상이 나타났다. 붕합부 결합조직에서는 hematoxilin에 염색된 염증세포의 침윤이 두드러지게 나타났고 대조군에 비하여 직경이 증가된 혈관주위에서 주로 관찰

되었다.

CGRP 면역양성 신경섬유는 대조군에 비하여 현저한 증가를 보여 주로 혈관주위에 염주알 모양의 가는 신경섬유가 많이 관찰되었다.

4일군 (Fig. 4a, 4b)

약간붕합의 확대량은 100-150 μ m로 1일군과 거의 유사하게 나타났고 1일군에 비해서 특징적으로 혈관의 직경이 훨씬 확장되었다. 확장된 혈관 주위에서는 많은 염증세포의 침윤이 관찰되었고 미분화간엽세포가 널리 분포되었으며 골변연을 따라 미분화간엽세포에서 분화된 것이라 생각되는 조골양세포가 배열을 이루려는 초기단계의 양상이 관찰되었다.

CGRP 면역양성 신경섬유는 대조군에 비해서는 그 양이 증가되었으나 1일군에 비해서는 큰 차이를 보이지 않았고 주로 혈관주위에서 여러가닥의 염주배열이 뭉쳐진 형태를 보였다.

7일군 (Fig. 5a, 5b)

1일군, 4일군에 비해 확대된 양은 큰 차이를 보이지 않았으나 7일군에서는 염증세포는 거의 소실되고 특징적으로 상당히 크기가 큰 조골양 세포가 새로이 형성된 골변연을 따라 줄지어 배열되는 양상이 관찰되었고 혈관의 직경은 4일군에 비하여 현저히 감소되었다.

CGRP 면역양성 신경섬유는 1일군, 4일군에 비해서 감소되어 혈관주위에서 약간의 염색성이 관찰되었다.

14일군 (Fig. 6a, 6b)

염증세포의 침윤은 거의 사라지고 7일군에서 관찰된 것과 같은 세포의 배열은 관찰되지 않았으며 혈관의 직경은 4일군에 비해 감소하였고 골변연의 불규칙성도 감소되어 대체로 평행한 변연을 나타내었다.

CGRP 면역양성 신경섬유는 4일군에 비해 감소되었고 혈관주위에 약간의 염색성이 관찰되었다.

IV. 고 찰

백서의 정중구개봉합부는 급속성장기에는 일시적으로 골단형태의 연골이 존재하다가²⁸⁾ 구치가 맹출될 때까지는 연골내골화형태의 골형성과 연관된 연골이 나타나고 그 이후에는 봉합부의 변연을 비활성성의 초자양 연골성 부위(inactive hyaline cartilage zone)가 가교를 이루게 된다.²⁾ 이러한 백서에서의 정중구개봉합부연골은 하악골의 하악과두연골에서처럼 2차연골로서 어른쥐가 될 때까지 계속 존재하며 국소적인 기계적자극에 대해 과두연골처럼 형태변화, 골개조반응등의 변화가 일어난다. 여러 신경전달물질 중 CGRP는 주로 지각신경에 존재하며¹⁾ 중추신경계에서는 glutamate, aspartate등과 같은 excitatory amino acid에 의한 동통의 전달을 substance P(SP)와 함께 조절한다고 알려져 있고 뇌척수액의 생성³³⁾, neurotrophic factor의 분비조절²⁷⁾, 자율신경계의 조절기능³⁾이 있다고 보고되고 있다. 말초조직에서는 혈류증가^{19,24,34)}, 혈관 이완 효과 및 평활근 이완 효과³⁴⁾, 혈관 평활근세포의 DNA 및 단백질합성능 증가²²⁾, 그리고 혈관내피세포의 증식¹³⁾, 탐식세포 기능 조절²⁶⁾등의 기능이 있는 것으로 알려져 국소적 염증반응과 연관성이 있을 것으로 추측되고 있다.

구개부에서 CGRP 면역반응 신경섬유는 연구개보다는 경구개에서 훨씬 더 많이 분포하며 분비관이나 혈관주위에서 상피하층과 점막하층에서 망상(plexuses)형태로 분포하고 있고 경구개와 연구개의 상피에 침투되어 자유종말단이 된다. 이는 점막선 근처에서도 관찰되며 전방구개부의 골격근에 있는 근종판(motor end plates)에도 주행한다. 또한, 연구개에 존재하는 미뢰의 양극세포들도 CGRP에 면역양성

반응을 나타내며 구개부의 상피에 있는 신경섬유는 미뢰로 주행하거나 그 주위에서 발견된다.³¹⁾ 연구개나 경구개의 상피조직이나 분비관, 혈관주위에서 상피하조직과 점막하조직에 널리 분포되어 있는 많은 신경섬유들은 자극에 대해 반응하는 감각 수용체가 존재하여 가하여지는 기계적자극에 반응하고 동통, 위치감각, 압각, 촉각등의 감각을 중추신경계로 전달한다. 또한, 말초에 신경전달물질을 분비하여 염증반응을 매개하고 여러 세포의 활성화에 영향을 미쳐 기계적 자극에 대한 생물학적 반응을 매개하여 골개조를 일으키는데 CGRP도 치아이동과 구개확대시에 일어나는 염증반응과 동통전달, 골흡수 및 생성을 포함하는 조직의 흡수 및 재생에 관여할 것으로 생각되어 많은 연구가 진행되어 왔다.

Kimberly와 Byers¹⁶⁾, Khayat등¹⁷⁾은 백서구치 교합면에 와동을 형성하여 치수에 손상을 가한 5-6일 후 치수에 국소적 농양이 생기며 농양주위에 많은 염증세포의 침윤과 더불어 CGRP 면역반응 신경섬유가 많이 증식되며 많은 분지를 내는 sprouting현상을 관찰하였고, Saito등³²⁾은 50일령의 Wistar rat의 구치에 Waldo법으로 탄성고무를 삽입하여 CGRP 면역반응 신경섬유를 관찰한 결과 1일군에서 치주인대내 혈관주위의 CGRP 면역반응 신경섬유가 증가하였고, 3일군에서 치근단과 중앙부에 있는 혈관주위가 심하게 염색되어 가장 많은 증가를 보였으며, 5일군에서 사라지기 시작하여 7일군에서는 대조측과 거의 비슷한 정도가 되었다고 하였으며, 전과 김⁴⁰⁾은 백서 전치에 .014" stainless steel helical spring을 이용하여 75gm의 견인력을 가하여 치아이동을 한 실험에서 치아이동에 반응하는 치수, 치주인대, 변연치은내의 염증부위에서 CGRP와 SP의 발현이 많고 교정력을 가한 1일째에서부터 대조군에 비해 CGRP가 증가하여 4일째까지 크게 증가한 후 감소되며 28일째에서 대조군보다는 많은 관찰이 보인다고 하였는데 본 실험에서도 1일군에서 CGRP 면역반응성이 크게 증가되어 4일군에서 유지되었다가 7일군에서는 오히려 감소하는 경향을 보여 그 결과가 유사하였다.

Kvinnslund와 Kvinnslund²⁰⁾는 체중 140-150gm의 백서를 대상으로 상악 제1대구치에 30-50gm의 교정력을 가한 5일 후 희생시켜 CGRP 면역반응 신경섬유의 변화를 관찰한 결과 실험측 치아에서 치주인대내 CGRP면역반응 신경섬유의 형태의 변화, 밀도, 염색강도의 증가가 있음을 보고하였고, Davidovitch등⁷⁾도 12-18개월된 고양이에게 80gm정도의 후방치체이동의

힘을 적용시킨 후 희생하여 관찰한 실험에서 대조측은 CGRP면역반응성을 보이는 세포가 나타나지 않았으나, 교정력 적용 1시간후 신장측 치주인대의 많은 세포에서 CGRP면역양성반응을 나타내었고, 48시간 후에는 신장측 세포의 면역반응성이 더욱 높아져 7-28일 동안 지속되었다고 보고하였으며, 성³⁸⁾도 백서 상악 대구치에 80gm내외의 교정력을 가한 실험에서 3일, 7일군에서는 치주인대내 CGRP면역반응 신경섬유가 많이 증가되었으나, 12시간, 1일군에서는 오히려 감소되었다고 보고한 바 있다. 이는 본 실험과는 약간 상이한 결과를 보였는데 그것은 적용하는 교정력의 차이 즉, Saito등³²⁾의 탄성고무 삽입과 전과 김⁴⁰⁾의 stainless steel, 본 실험에서의 Elgiloy를 이용한 spring은 초기에는 파괴적인 힘이 가해졌다가 일단 치아가 이동되면 곧 힘이 소실되는데 반해 Kvinnsland와 Kvinnsland²⁰⁾, 성³⁸⁾의 연구에서 사용한 코일 스프링은 지속적인 교정력이 가해지므로 초기에는 탄성고무나 stainless steel 혹은 Elgiloy helical spring보다 약한 힘이 가해지고 시간이 지남에 따라 지속적인 힘이 가해져 CGRP 면역반응 신경섬유가 증가된 채 유지될 수 있었던 것으로 생각되며 이는 본 실험에서 시간경과에 따라 치아의 이개정도나 구개봉합부의 확대된 량이 1일군에서 크게 증가한 후 4일, 7일, 14일군에서는 그 정도가 유지된다는 점에서도 추측 가능하다.

정중구개봉합부에 기계적 자극을 가해 확대시킨 경우 처음에는 봉합부 결합조직이 파괴되고 혈관은 확장되며 출혈, 부종등의 초기 염증반응이 나타나고 경우에 따라서는 낭종과 유사한(cystlike)형태의 부위가 형성되기도 하며 미성숙단계의 골조직 형성을 위한 골아세포가 결집된다. 시간이 지나면서 골의 변연부에 새로운 골소주가 형성되기 시작하고 톱니모양으로 얇고 가는 골선전이 봉합부 결합조직내로 자라게 된다. 그 후 이미 존재하는 전상악골에서 골흡수를 동반한 골개조가 급속히 일어나고 견인력이 가해지는 봉합부 결합조직의 콜라겐 섬유의 말단과 측면에서 골성장(bony growth)이 일어난다.³⁵⁾

어떤 자극이 주어졌을 때 신경섬유가 sprouting된다는 의미는 아직 확실히 밝혀져 있지 않다. Yamaura등³⁷⁾은 신경섬유가 증가된다는 것은 손상된 조직의 hyperalgesia에 기여한다는 것을 의미한다고 하였고, 어떤 이들은 CGRP가 신경원성 염증(neurogenic inflammation)의 중요한 매개체의 하나로 관여하고 이러한 신경섬유의 증식은 손상된 조직

으로의 많은 양의 매개체를 분비하기위한 일종의 과정인 것으로 추측하였는데 본 실험에서는 1일군과 4일군에서 CGRP 면역양성 신경섬유의 sprouting양상이 관찰되었다. 그와 함께 봉합부 결합조직에서는 혈관의 확장과 확장된 혈관주위에서의 많은 염증세포의 침윤이 관찰되어 이 시기의 신경섬유의 증식은 기계적 자극에 대한 초기반응에서의 신경원성 염증반응과 관련된 증식일 것으로 생각된다. 또한 임상에서 정중구개봉합부에 확대력을 가하였을 때 초기에 동통을 호소하다가 교정력 적용 3-4일경에 동통이 사라지면서 그 이후에 확대된 상태가 유지되는 것으로 보아 이들 양상은 초기에 혈관이 확장되고 염증매개물질들이 분비, 이동되며 염증세포가 침윤되고 동통이 유발되는 일련의 염증반응과 관련지어 생각해 볼 수 있겠다.

치아에 교정력이 가하여질 때 치주인대에서는 파골세포와 조골세포의 활성이 일어나는데 압박측에서의 골흡수는 교정력 적용후 20-30시간 이후에 골수나 골표면에 파골세포가 나타나 개시되고²⁹⁾ 50시간후에 파골세포의 활성도가 가장 높아진다고 알려져있고³⁰⁾ 신장측에서의 조골세포는 교정력 적용후 36-50시간후에 조골세포의 세포분열이 일어나며 이후 osteoid가 침착된다고 알려져 있다.²⁹⁾ Davidovitch등⁸⁾은 CGRP가 골흡수를 촉진시킨다고 하였고, Heyeraas등¹⁴⁾은 CGRP 면역반응 신경섬유가 혈관과 연관성 없이 조골세포와 상아질 근처에 그리고 백악질 근처에 나타나는 것으로 보아 경조직에 대한 자극효과가 있을 것이라 보고하였다. Hill과 Elde¹⁵⁾는 CGRP는 골흡수를 방해하고 vasoactive intestinal peptide(VIP)는 골흡수를 촉진하는데 지각신경의 CGRP, SP와 교감신경의 VIP가 함께 골개조에 중요한 역할을 할 것이라 보고하였고, Bernard와 Shih⁴⁾는 CGRP가 조골자극효과가 있다고 보고하였다. 이처럼 골흡수에 대한 CGRP의 효과에 대해서는 의견이 다양하지만 생체에서는 CGRP의 골세포에 대한 직접적인 영향뿐만 아니라 CGRP에 의한 혈관 이완 작용에 이은 염증세포의 이동, 염증매개물질의 분비로 인한 골세포에 대한 간접적인 영향이 서로 반영되므로 CGRP가 골개조에 관여한다고 할 수 있을 것이다. 본 실험에서는 7일군에서 새로이 형성된 골변연을 따라 미분화 간엽세포에서 분화된 것으로 보이는 조골양세포의 배열을 관찰할 수 있었는데 이 시기에서는 CGRP 면역반응 신경섬유가 크게 증가하지 않아 CGRP의 골개조와의 관련성은 본 실험에서 추측하기 어려웠다. 따라서 골

개조와 CGRP와의 연관성을 밝히기 위해서는 보다 더 적절한 실험모델의 개발이 필요할 것이며 CGRP가 구개융합 확대나 치아이동등의 교정력 적용시 일어나는 반응성 변화에 관여하는 그 기전에 관해서도 다른 생화학적인 연구가 필요할 것이다.

V. 요약

정중구개융합부확대술의 기계적 자극에 의한 중추신경계에서는 동통의 전달을 조절하고, 말초조직에서는 혈관이완, 면역체계의 조절, 탐식세포기능 조절등의 염증에 관여하며 골개조에도 관여하는 것으로 알려진 CGRP 면역양성 신경섬유의 분포변화를 시간경과에 따라 관찰해보고자 본 실험을 시행하였다.

250gm 내외의 Sprague-Dawley 웅성백서를 정상대조군과 장치장착 후 경과시간에 따라 1일, 4일, 7일, 14일 경과군으로 나누어 각 군에 4마리씩을 배분하여 .016" Elgiloy 선재로 helical spring을 제작하여 상악양측 중절치에 장착시켜 봉합부를 이개시킨 후 희생시켜 냉동절편을 형성하여 토끼의 항체를 이용해서 면역조직화학염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 대조군에서 약간 봉합부 결합조직의 CGRP 면역반응 신경섬유는 거의 관찰되지 않았다.
- 1일군에서는 대조군에 비해 CGRP 면역반응 신경섬유가 현저한 증가를 보였으며 주로 혈관 주위에 염주알 모양의 가는 신경섬유가 관찰되었다.
- 4일군에서는 CGRP 면역반응 신경섬유가 대조군에 비해서는 현저한 증가를 보였으나 1일군에 비해서는 크게 증가하지 않았으며 혈관의 크기가 훨씬 확장되어 관찰되었다.
- 7일군에서는 특징적으로 조골양세포가 새로이 형성된 골변연을 따라 줄지어 배열되는 독특한 양상이 관찰되었고 신경섬유의 수는 4일군에 비하여 감소하고 혈관의 직경도 감소되었다.
- 14일군에서는 CGRP 면역반응 신경섬유가 7일군과 유사한 분포를 보였으며 확대에 의한 골변연의 불규칙성도 대체로 감소되었다.

위의 결과로 미루어 보아 CGRP 면역반응 신경섬유는 정중구개융합의 확대시 초기에 일어나는 신경원성 염증반응에 주로 관련되어 증식되는 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, H. G., Ong, E. S., and Evans, R. M. : Alternative RNA processing in calcitonin gene expression mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298:240-244, 1982.
2. Anderson, J. H., Furstman, L. and Bernick, S. : The postnatal development of the rat palate. *J. D. Res.*, 46:366-372, 1967.
3. Bereiter, D. A. and Benetti, A. P. : Microinjections of calcitonin gene-related peptide within the trigeminal subnucleus caudalis of the cat adrenal and autonomic function. *Brain Res.*, 558:53-62, 1991.
4. Bernard, G. W. and Shih, C. : The osteogenic stimulating effect of neuroactive calcitonin gene-related peptide. *Peptides*, 11:625-632, 1990.
5. Biederman, W. : Rapid correction of class III malocclusion by midpalatal expansion. *Am. J. Orthod.*, 63:47-55, 1973.
6. Cleall, J. F., Bayne, D. I., Posen, J. M. and Subtelny, J. D. : Expansion of the mid-palatal suture in the monkey. *Angle Orthod.* 35:23-35, 1965.
7. Davidovitch, Z., Gogen, M. H., Okamoto, Y. and Shanfeld, J. L. : Neurotransmitters and cytokines as regulators of bone remodeling, in bone biodynamics in orthodontic and orthopedic treatment. Vol 27. Craniofacial growth series. Center for human growth and development. The University of Michigan, Ann Arbor, Michigan pp.141-162, 1991.
8. Davidovitch, Z., Rosol, T. and Shanfeld, J. L. : Direct effects of neurotransmitters on bone resorption. *J. Dent. Res.*, 69:206, 1990.
9. Debbane, E. F. : A cephalometric and histologic study of the effect of orthodontic expansion of the midpalatal suture of the cat. *Am. J. Orthod.*, 44:187-219, 1958.
10. Derichsweiler, H. : Recherches experimentales faites sur l' animal, etc. *Trans. E. O. S.* pp. 223-232, 1957.
11. Gardner, G. E. and Kronman, J. E. : Cranioskeletal displacements caused by rapid palatal expansion in the rhesus monkey. *Am. J. Orthod.*, 59:146-155, 1971.
12. Gazelius, B., Edwall, B., Olgart, Lindberg, J. M., Hökfelt, T. and Fischer, J. A. : Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance-P in sensory nerves of cat dental pulp. *Acta Physiol. Scand.*, 130:33-40, 1987.
13. Haegerstrand, A., Dalsgaard, C. J., Jonzon, B., Larsson, O. and Nilsson, J. : Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3299-3303, 1990.

14. Heyeraas, K. J., Kvinnsland, I., Byers, M. R. and Jacobson, E. B. : Nerve fibers immunoreactive to protein gene product 9.5, calcitonin gene-related peptide, substance P, and neuropeptide Y in the dental pulp, periodontal ligament and gingiva in cats. *Acta Odontol, Scand.*, 51:207-221, 1993.
15. Hill E. L. and Elde R. : Calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibers in mandibular periosteum of rat : Evidence for primary afferent origin. *Neuroscience Letters*, 85:172-178, 1988.
16. Kimberly, C. L. and Byers, M. R. : Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *Anat. Rec.*, 222:289-300, 1988.
17. Khayat, B. G., Byers, M. R., Taylor, P. E., Mecifi, K. and Kimberly, C. L. : Responses of nerve fibers to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by calcitonin gene related peptide immunohistochemistry. *J. Endo.*, 14(12):577-578, 1988.
18. Kjartansson, J., Dalsgaard, C. J. and Jonsson, C. E. : Decreased survival of experimental critical flaps in rats after sensory denervation with capsaicin. *Plast. Reconstr. Surg.*, 79(2):218-220, 1987.
19. Kvinnsland, I., Heyerass, K. J. and Ofjord, E. S. : Effects of experimental tooth movement on periodontal and pulpal blood flow. *Eur. J. Orthod.*, 11:200-205, 1989.
20. Kvinnsland, I. and Kvinnsland, S. : Change in CGRP-immunoreactive nerve fibers during experimental tooth movement in rats. *Eur. J. Orthod.*, 12:320-329, 1990.
21. Martenson, G. : Rhinologic aspects of maxillary suture opening. *European Orthod. Soc. Rep.*, 32:291-293, 1956.
22. Mitsuhashi, M. and Payan, D. G. : The mitogenic effects of vasoactive neuropeptides on cultured smooth muscle cell lines. *Life Science*, 40(4):853-861, 1987.
23. Murray, J. and Cleall, J. F. : Early tissue response to rapid maxillary expansion in the midpalatal suture of the rhesus monkey. *J. Dent. Res.*, 50:1654-1660, 1971.
24. Olgart, L., Edwall, L. and Fried, K. : Cat dental pulp after denervation and subsequent re-innervation : Changes in blood-flow regulation and distribution of neuropeptide GAP-43 and low affinity neurotrophin receptor-like immunoreactivity. *Brain Res.*, 625:109-119, 1993.
25. Pavlin, D. and Vukicevic, D. : Mechanical reactions of facial skeleton to maxillary expansion determined by laser holography. *Am. J. Orthod.*, 85:498-507, 1984.
26. Peck, R. : Neuropeptide modulating macrophage function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 496:264-270, 1987.
27. Risling, M., Dalsgaard, C. J., Frisen, J., Sjögren, A. M. and Fried, K. : Substance P, calcitonin gene-related peptide, growth-associated protein-43 and neurotrophin receptor-like immunoreactivity associated with unmyelinated axons in feline ventral roots and pia mater. *J. Comp. Neurol.*, 339:365-386, 1994.
28. Pitchard, J. J., Scott, J. H. and Girgis, F. G. : The structure and development of cranial and facial structures. *J. Anat.* 90:73-86, 1956.
29. Reitan, K. : Biochemical principles and reactions, in Graber, T. M. and Swain, B. F.(editor) : *Orthodontic, current principles and techniques*, C. V. Mosby Co., St. Louis, 1985, pp.101-192.
30. Roberts, W. E. and Ferguson, D. J. : Cell kinetics of the periodontal ligament, in Norton, L. A. and Burstone, C. J.(editor) : *The biology of the tooth movement*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1986, pp.55-70.
31. Rodrigo, J., Polak, J. M., Terenghi, G., Lerrantes, C. and Ghatei, M. A. : Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive sensory and motor nerves of the mammalian palate. *Histochemistry*, 82:67-74, 1985.
32. Saito, I., Ishii, K., Hanada, K., Sato, O. and Maeda, T. : Responses of calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibers in the periodontal ligament of rat molars to experimental tooth movement. *Archs Oral Biol.*, 36(9):689-692, 1991.
33. Silverman, J. D. and Kruger, L. : Calcitonin gene-related peptide immunoreactive innervation of the rat head with emphasis on specialized sensory structure. *J. Comp. Neurol.*, 280:303-330, 1989.
34. Stjåme, P., Lundbald, L., anggard, A., Hökfelt, T. and Lundberg, J. M. : Tachykinins and calcitonin gene-related peptide : Co-existence in sensory nerves of the nasal mucosa and effects on blood flow. *Cell Tissue Res.*, 256:439-446, 1989.
35. Storey, E. : Tissue response to the movement of bones. *Am. J. Orthod.*, 64(3):229-247, 1973.
36. Ten cate, A. R., Freeman, E. and Dickinson, J. B. : Sutural development : Structure and its response to rapid expansion. *Am. J. Orthod.*, 71:622-636, 1977.
37. Yamaura, Y., Yamazaki, M. and Hirai, G. : Immunohistochemical investigations on the nerve fibers of carious teeth. *J. Dent. Res.*, 67(special issue):134, 1988.
38. 성 정옥, 박 효상 : 실험적 치아이동에 의한 백서 구치 치주인대내 CGRP 면역양성 신경섬유의 변화. *대한치*

과교정학회지 제 26권 제 5호 : 581-590, 1996.
 39. 이 우주 : 성견에 있어서 정중구개 융합선의 급속확장에 관한 연구 : 연세치대 논문집. 제 2권 2호 : 37-43, 1983.
 40. 전 인섭, 김 상철 : 백서의 실험적 치아이동시 substance P 및 calcitonin gene related peptide 에 관한 면역조직

화학적 연구 : 원광 치대 논문집. 제 1권 7호 : 63-84 1997.
 41. 주 정신, 유 영규 : 성견에 있어서의 정중구개 융합선의 급속확장에 의한 상악골 주위 봉합의 조직학적 변화에 관한 연구. 대한치과교정학회지 제 11권 제 2호:161-167, 1981.

-ABSTRACT-

Changes in CGRP-immunoreactive Nerve Fibers during Expansion of Midpalatal Suture of the Rat

Bo-Kyung Kim*, Kuk-Pil Park**, Hee-Moon Kyung*, Oh-Won Kwon*, Jae-Hyun Sung*

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

**Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Kyungpook National University

Midpalatal suture expansion is often used for patients having narrow maxillary arch, cleft palate, respiratory handicap with narrow nasal cavity. CGRP has been known as a modulator of pain transmission in central nervous system and a local effector to peripheral tissue causing vasodilation, increase of blood flow, modulation of immune system, regulation of macrophagic function and stimulation of bone formation.

To investigate changes of CGRP-immunoreactive nerve fibers in midpalatal suture during the expansion, immunohistochemical study was performed by using rats. Experimental rats (10 weeks, 250 gm) were divided into five groups (control, 1, 4, 7, 14 days group (each n=4)) and applied orthodontic force (approximately 200gm) to upper anterior incisors. Frozen sections of midpalatal suture area were immunostained by using rabbit antisera.

The results were as follows.

- The CGRP-immunoreactive nerve fibers were hardly observed in control group.
- In 1 day group, the CGRP-immunoreactive nerve fibers were more increased around the vessels than control group.
- In 4 days group, the CGRP-immunoreactive nerve fibers were more increased than control group, but not more increased than 1 day group. Vascular diameter was more enlarged.
- In 7 days group, especially, hematoxin affinity of cells was remarkable and cells were arranged along the bone margin. The CGRP-immunoreactive nerve fibers were more reduced than 4 days group and vascular diameter was also reduced.
- In 14 days group, the CGRP-immunoreactive nerve fibers were similar to those of 7 days group and the irregularity of bone margin was almost recovered.

In Conclusion, the CGRP-immunoreactive nerve fibers may be related to initial neurogenic inflammatory reaction in expanding mid-palatal suture.

KOREA. J. ORTHOD. 1999 ; 29 : 73-81

* Key words : midpalatal suture, expansion, CGRP-immunoreactive nerve fibers, inflammatory reaction