

BAPN으로 유도된 구개파열 백서의 osteonectin 발현 양상에 대한 연구

태기출¹⁾·김은철²⁾·이선경³⁾

이 연구는 정상구개백서와 비교하여 구개 파열 백서에서 osteonectin 발현 양상에 대한 관찰하기 위해 시도되었다. 임신 9일째 백서 4마리를 구입하여 1마리의 대조군과 3마리의 실험군으로 구분한후, beta-aminopropionitrile를 임신 13일째 1g/kg 체중 비율로 실험군에 투여하였다. 그 후 임신 20일째 백서를 모두 희생하여 대조군에서는 12마리, 실험군에서는 33마리의 백서 태자를 얻어 그 중 실험군에서 총 6마리의 구개파열 백서태자를 얻었다. 구개파열 백서태자 6마리를 각3마리씩 면역조직화학염색과 Western blot검사를 위해 나누고, 대조군의 구개와 구개파열군의 구개에서 osteonectin 발현양상은 다음과 같은 결과를 보였다.

1. 구개파열 백서의 간엽조직에서 osteonectin 발현 양상은 대조군에 비해 현저히 낮은 형태를 보였다.
2. 구개파열 백서의 골아세포와 골세포에서 osteonectin 발현 양상은 대조군에 비해 낮은 형태를 보였다.
3. 구개파열 백서의 비강 상피에서 osteonectin 발현 양상은 구개 상피의 발현양상과 차이가 없었다.
4. Western blot분석에서 구개 파열 백서의 osteonectin 밴드 굵기와 두께는 정상군에 비해 얇고 희미하였다.

주요단어: 구개파열, Osteonectin, 면역조직화학, Western blot

서 론

두개안면기형은 1) 배아형성과 두개안면구조의 초기 병합과정에서 장애, 2) 신경관형성과 구인두의 초기형성장애, 3) 세포집단의 기원과 이동, 상호작용의 장애, 4) 기관계 형성장애, 5) 조직의 최종분화 장애 같은 원인에 의해 다양한 형태로 발현된다.^{15,30)} 이러한 두개안면기형중 구개파열은 흔히 발생하는 선천성 기형으로 많은 연구가 진행되고 있지만 정확한 원인과 발병 역학은 알 수 없다. 구개 파열은 종종 구순 파열을 동반하기도 하고, 발생 형태에 따라 단순치조

파열과 편측성 파열, 양측성 파열, 점막하 파열등으로 나눈다.³⁷⁾ 이런 구개파열은 출생당시 수유와 심미적 목적으로 수술을 시행하게 되어 이 때 형성된 반흔조직은 상하악 성장 발육에 영향을 주어 교정학적 문제를 일으키고 장기간의 복합치료가 요구된다.

실험적으로 corticosteroid나 cyclophosphamideem을 이용하여 구개파열을 유도한 보고가 있으며, 초기 동물실험에서 β -aminopropionitrile(BAPN)를 사용하여 구개파열을 유도하였다.⁷⁾ BAPN은 콜라겐의 교차 결합을 억제하는 기전을 갖는 약물로 정확한 기전은 알려져 있지 않지만, 2차 구개 형성시점에 투여할 때 구개파열을 유도하는 것으로 보고된다.⁷⁾

사람에서 구개형성과정은 발생 4~7주 사이 전비 돌기와 정중 비연골, 전상악골이 형성되고, 7~12주 사이 경연구개로 구성된 2차 구개가 형성된다. 반면 백서의 구개형성과정은 발생 13일째 시작되어 17일

1) 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 원광치의학연구소, 조교수

2) 원광대학교 치과대학 구강병리학 교실, 조교수

3) 원광대학교 치과대학 구강병리학 교실, 조교

* 이 연구는 1999년도 원광대학교 교내 연구비 지원을 받음

째 완성되는데, 좌우의 구개선반이 서로 근접하여 만나는 과정에서 구개돌기에 내재하는 힘이 존재하는데, 아직 그 본질은 잘 모르고 있다.^{6,9)} 고농도의 glycosaminoglycans이 물을 흡수하여 구개돌기를 부풀게 한다는 주장과 구개돌기 내부에 수축성 섬유모세포가 관여한다는 주장이 있는데,⁴⁰⁾ 조직발생학적으로 융합과정(fusion)과 병합과정(merging)으로 수반하게 되며, 이 과정에 TGF-β나 EGF 같은 성장요소(growth factors)와 조절기전이 관여하게 된다. 또한 구개골 대사과정에는 골아세포와 골세포, 골수세포, 섬유아세포, 혈액내 상피세포, 면역 세포등 세포성분(cellular components)과 많은 cytokine, 아라키도닉 산성 유래물질, 이온과 기질 단백질 같은 중간 기질(intermediate matrix substance)이 관여된다.^{21,24,25,31)}

중간 기질은 골아세포와 파골세포를 조절하는 역할로 골 발생에 관여하는데, 그 중 osteonectin (SPARC, secreted protein, acidic and rich in cysteine)은 세포외 기질중 비교원성 성분의 기질 단백질로 Ca⁺⁺와 결합하여 골 발생 과정 및 치수와 상아질, 법랑질 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{13,33)} Osteonectin은 30~43kDa의 인산화 당단백의 하나로 유기질 성분에 존재하며, 연조직 배양에서 세포외 거대물질의 이동과 분열, 합성을 조절하며, 조직 치유, 형태 형성의 기능이 있는 것으로 보고된다.³³⁾ 정상조직의 세포에서 osteonectin발현이 steroidgenic 세포, 연골세포, 용모막 세포, 평활근 세포, 혈관내피세포에 국한되어 있지만 최근에는 골조직을 형성하는 종양에서도 발현하는 것으로 알려져 있다. 또한 이 기질 단백질은 연조직보다 경조직에서 50배 이상 더 잘 발현되는 물질로 골아세포와 같은 세포 성분의 분화 지표로 이용되지만, 경조직에서 상피성 세포에 부착 기전에 osteonectin이 관여하는지는 분명하지 않다.^{13,27,34)} 또한 구개형성 및 구개파열 형성에 관련하여 중간 기질인 osteonectin역할을 규명하기 위해 면역염색화학법과 Western blot분석법은 이루어 지지 않았다.

이에 osteonectin이 석회화 물질 형성 및 골 개조에 밀접하게 관여한다는 선학들의 보고에 의해 구개파열 백서에서 골 개조 및 형태 형성에 관여하는 osteonectin의 역할을 규명하고자 시도되었다.

재료 및 방법

다물 동물사육 연구소로부터 4마리의 임신 10일째

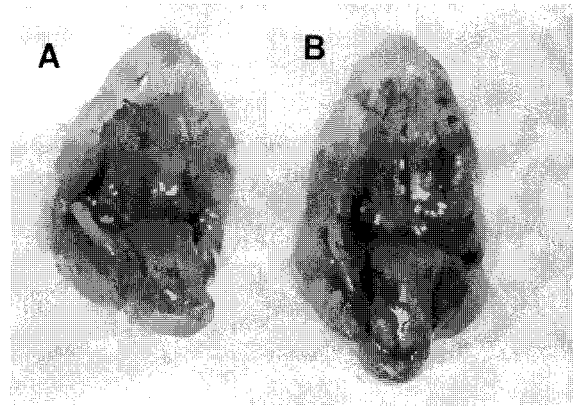


Fig. 1. Palate morphology of rat fetus on 20'th day p.c.
A: Normal palate B: Cleft palate

Table 1. Incidence of palatal cleft in rat fetus.

	Group 1	Group 2
Number of delivery	12	33
Number of cleft formed fetus	0	6

Group 1: Control group

Group 2: BAPN administered group

Sprague-Dawley계 백서를 구입하여 플라스틱 케이지에 톱밥과 고휘형 사료, 물을 공급하였다. 그 후 임신 백서를 1마리는 대조군으로, 3마리는 실험군으로 분류한 후 임신 13일째 beta-aminopropionitrile monofumarate salts(BAPN, (C₃H₆N₂)₂ C₄H₄O₄, Sigma Co.)를 1g/kg 체중 비율로 구강 투여하였다. 그 후 임신 20일째 임신 백서를 희생한 후 백서태자를 추출한 후, 대조군 백서태자와 실험군 백서태자로 구분한 후 실험군중 구개파열 백서 태자를 실험에 이용하였다 (Fig. 1, Table 1). 총 6마리의 구개파열 백서태자를 얻어 3마리는 면역조직화학염색에, 다른 3마리는 Western blot 검사에 이용하였다.

1. 면역조직화학 염색

추출한 백서태자의 두경부를 10%중성 포르말린에 고정하고 cassette에 맞게 자른 후 5~10% nitric acid 성분의 탈칼슘 용액을 이용하여 탈회를 시키고

70-100% alcohol로 단계적 탈수한 뒤에 xylene으로 투명시키고 48°C의 soft paraffin과 58°C의 hard paraffin에 embedding하여 냉동실에 30분 이상 보관한 후 microtome으로 4~5 μ m 두께로 연속 박질편을 제작하고 ProbeOn Plus 슬라이드(Fisher Scientific, USA)에 부착한 후 충분히 건조시켰다. 염색은 ProbeOn Plus 슬라이드를 맞대서 생기는 capillary gap action 원리를 이용한 Microprobe System(Fisher Scientific, USA)을 사용하였고, 면역조직화학검사를 위해 LSAB (labeled streptavidin biotin, Dako Co, Denmark) kit를 이용하였으며, osteonectin (Santa Cruz, Polyclonal, USA) 일차항체를 1/50로 희석하여 사용하여 30분간 침투시키고, 이차항체로는 anti-mouse Ig G를 사용하여 10분간 부란시켰으며, 발색을 위해 AEC(Aminoethyl Carbazole, Zymed Co, USA)를 이용하였다. 그리고 streptavidin alkaline phosphatase로 10분간 처리하고 발색시킨 후, Mayers hematoxylin으로 대조염색하고 탈수와 투명 과정을 거친뒤에 건조시켜 glycerine gelatine으로 mounting한 후 검경하였다.

2. 면역조직화학 염색 결과 분석 방법

염색정도의 분석을 위해 슬라이드 표본을 저배율로 관찰하여 염색 양상이 미만성인가 또는 특정부위에 국한된 것인가를 판별하고 고배율로 osteonectin이 어떤 세포에 양성으로 나타나는가를 관찰하였다. 항체에 대한 양성반응을 관찰하여 전혀 염색성을 관찰할수 없는 경우를 음성(-), 거의 염색성을 관찰할수 없는 경우를 경미(\pm), 중등도의 세포질내 염색상을 보이는 경우(+), 매우 강한 세포질내 염색상을 보이면서 양성세포가 밀집되어 있는 경우(++)로 판독하여 상대적인 4단계로 표현하고 동일한 병명의 여러 개 표본을 중복 검경하여 최빈값을 선택하였다.

3. Western blot analysis

각각의 실험군과 대조군으로부터 상악 및 하악을 분리하여 TRI reagent(Montgomery, USA)로 단백질을 추출한 후 ELISA분석과 분광흡광도를 이용하여 정량하고, 이 정량의 단백질을 SDS-page와 Western blot에 이용하였다. Protein standard marker와 단백질에 동량의 loading buffer를 첨가하고, 95°C에서 denaturation시킨후 8% SDS-page를 사용하여 전기

영동한후 Coomassie brilliant blue 염색을 시행하였다. 전기영동한 gel을 polyvinylidene difluoride(PVDF, Bio-rad Co) membrane에 transfer시키고, 일차 항체 anti-osteonectin(Zymed Co)와 이차 항체 mouse anti-Ig G를 각각 1시간씩 처리한 후 ECL chemiluminescence detection kit로 필름에 detection한 후 Image Pro program을 이용하여 30~43kDa에 해당하는 밴드의 optical density를 측정하였다.

연구 결과

1. 면역조직화학 염색

대조군에서는 백서태자의 상악 구개의 형태는 비연골과 황적 구개돌기의 완벽한 융합이 보였는데, 특히 융합이 발생된 곳에서 상피는 보이지 않았으며, 약간의 공포가 관찰되었다(Fig. 2-A). 대조군의 비연골에서 골양조직에서 강한 osteonectin 발현이 보였고, 골세포에서는 중등도, 연골은 골막성 골에 비해 약한 정도로 발현되었다. 또 대조군의 황적 구개돌기에서 간엽조직은 약한 정도에서 중등도의 발현을, 상피조직에서는 중등도의 발현을 보였다(Fig. 2-B).

반면 구개파열된 백서의 구개형태는 상피 띠가 연속된 형태로 비연골과 수평구개돌기가 분리된 채로 관찰되었고, 구개의 전방부보다 후방부에서 더 파열도가 심하였다(Fig. 1, 3-A). 한편 상피의 폭경이 구개돌기의 근심상방부(medial edge epithelium)에서 다른 부위의 것과는 다르게 좁은 형태로 관찰되었고, osteonectin 발현이 강하게 발현되었다. 구개파열 백서의 구개돌기에서 osteonectin 발현은 골양조직이 대조군에 비해 적게 형성되었지만, 골아세포는 큰 차이를 보이지 않았다. 구개돌기의 구개측 상피에서 osteonectin 발현은 대조군의 것과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3-C,D). 비연골에서 osteonectin 발현은 골아세포와 골세포에서 중등도의 발현을 보였지만 간엽조직에서는 경미하였다(Fig. 3-B).

2. Western blot analysis

Band의 optical density 확인을 위해 Image Pro program을 사용한 결과 구개파열군의 상악에서 osteonectin 발현이 대조군의 것에 비해 약하고 폭경이 얇은 형태를 보였다. 또한 대조군의 하악이 구개파열군의 하악보다 더 뚜렷한 형태를 보였다(Fig. 4).

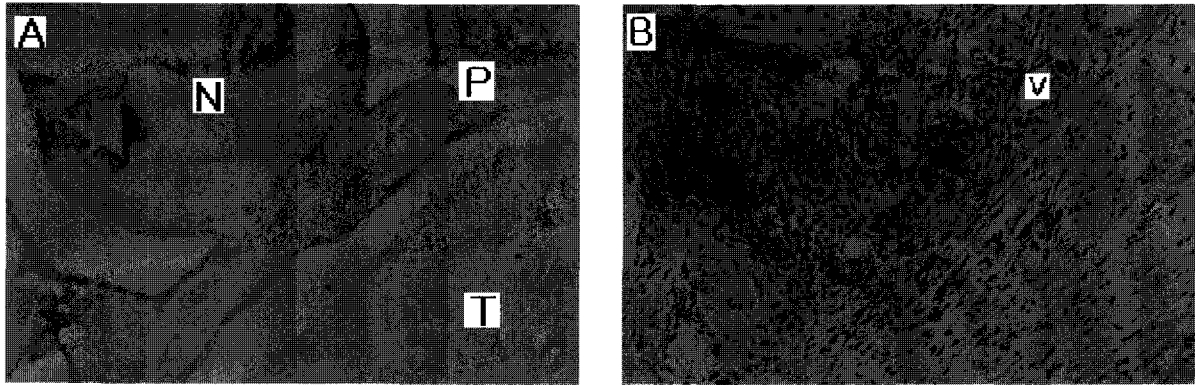


Fig. 2. Osteonectin expression on normal palate rats.

- A: Osteonectin was heavy expressed on bone formed area.
(N: nasal septum, P: palatal process T: tongue)
- B: Osteonectin was heavy expressed on osteoblast and osteocyte in midpalatal area.
(V: vacuole)

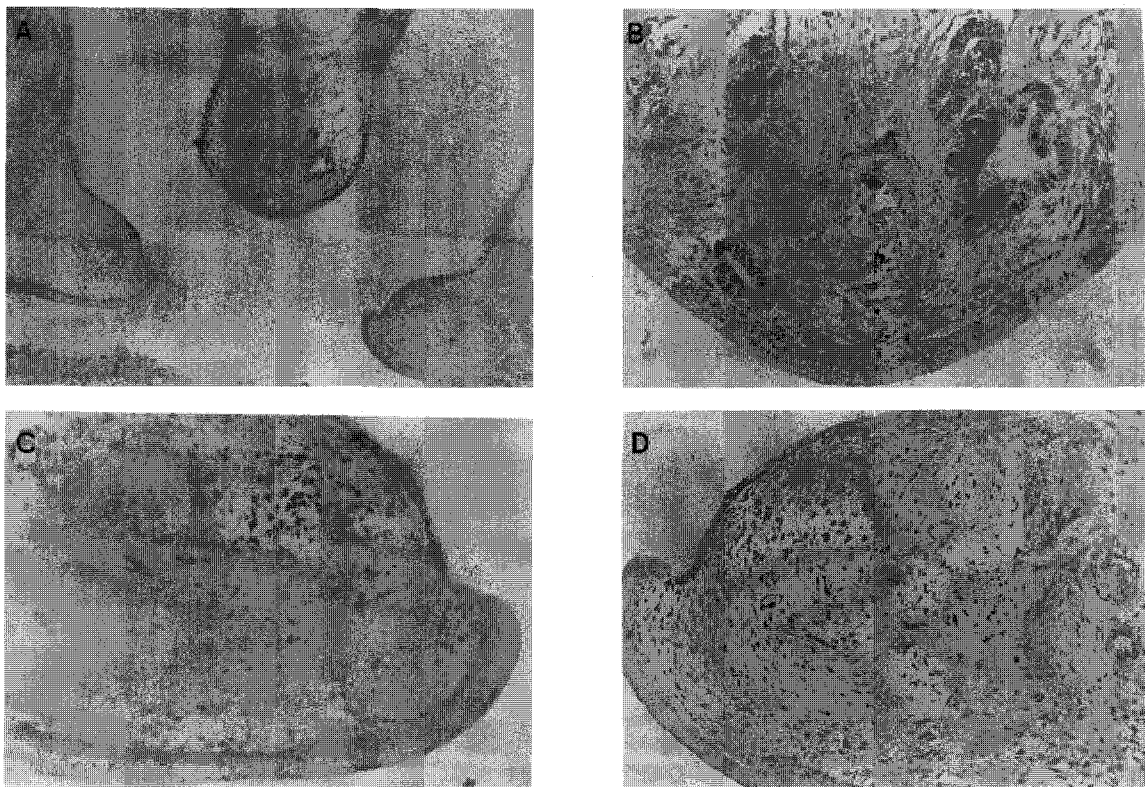


Fig. 3. Osteonectin expression pattern on cleft rats.

- A: Gross morphology,
- B: Osteonectin was moderate expressed on apex of nasal process.
- C&D: Osteonectin was slight expressed on mesenchymal cell in palatal process.

Table 2. Degree of osteonectin expression in immunohistostain.

	Osteoblast		Osteocyte		Mesenchymal cell		Epithelium	
	Nasal process	Palatal process	Nasal process	Palatal process	Nasal process	Palatal process	Nasal process	Palatal process
Control group	++	++	++	+	++	~+	++	++
Cleft group	+	+	+	+		-~	++	++

-: negative, ±: slight, +: moderate, ++: heavy

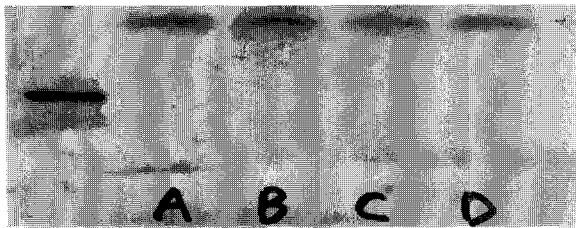


Fig. 4. Osteonectin expression with Western blot analysis.

(A: maxilla of control B: mandible of control.

C: maxilla of cleft group D: mandible of cleft group).

고찰

실험적 연구에서 태반 침투성, 유전적 안정성, 임신 기간의 단축등의 이유로 백서모델은 구개파열연구에 많이 사용된다.²⁰⁾ 구개파열을 유도하기 위해 비타민 A(retinoic acid)과 코티코스테로이드, cyclophosphamide, diazo-oxo-norleucine, 항발작성 약제등을 사용하는데,^{1,7,8,10,14,22)} 백서의 특이한 gene-type에 영향을 받는다. 이것은 발생단계에서 기형유발 약제에 선택적 감수성이 다르다는 것을 암시한다.¹⁴⁾ 이 연구에서는 BAPN을 사용하여 구개파열을 유도하였는데, 이 약제는 신생 콜라겐 합성을 억제하는 기능을 갖고 있는 것으로 보고되나 정확한 약동적 기전은 보고가 없다.¹⁷⁾

구개파열은 유전과 환경적 요인에 의해 나타나는데, 이런 요인들은 유전자 발현과 조절 요소, 리간드 수용분자, 두개신경능세포의 이주, 구개의 근심돌기의 저발육을 초래하는 간엽조직의 발육 이상등에 영향으로 일어난다.^{2,16)} 동물실험에서 구조조직항원적합체

(major histocompatibility complex, MHC)가 기형유발약제에 의한 구개파열에 관련되고, 이런 구조조직항원적합체는 백서에서는 17번 염색체, 사람에서는 6번 염색체에 존재한다.^{3,4)} Melnick등은 스테로이드 유발 구개파열에 민감한 종과 저항하는 종으로 나누었는데,²⁰⁾ 본 연구에서도 전체 BAPN투여 받은 백서태자 33마리에서 6마리만 발생한 것으로 보아 27마리는 구개파열 유도약물에 저항을 갖는 종으로 사료된다.²²⁾ 하지만 이런 유전적 특이성을 갖는 사람에 대한 연구는 보고되지 않는다.

구개형성에 밀접한 세포간 교통에는 연속적인 성장요소(growth factors)가 분자생물학적 과정을 유도하고 한다. 이 과정에 TGF-β와 EGF 같은 성장요소(growth factors)와 조절기전이 관여하게 된다.^{1,9,26)} 또한 구개골 발생과정에는 골아세포와 골세포, 골수세포, 섬유아세포, 혈액내 상피세포, 면역 세포등 세포성분(cellular components)과 많은 cytokine, 아라키도닉 산성 유래물질,이온과 기질 단백질 같은 중간기질(intermediate matrix substance)이 관여된다.^{13,33)} 중간기질은 골아세포와 파골세포를 조절하는 역할로 골 발생에 관여하는데, 그 중 osteonectin (SPARC, secreted protein, acidic and rich in cysteine)은 골과 내배엽에서 발현되는 30~43kDa의 분자량을 갖는 인산화 당단백의 하나로 유기질 성분 존재한다.¹¹⁾ Osteonectin은 세포외 기질중 비교적 성 성분의 기질 단백질성분으로 Ca⁺⁺와 결합하여 골 발생 과정 및 치수와 상아질, 범랑질 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{18,19,35)} 연조직 배양에서 세포외 거대물질의 이동과 분열, 합성을 조절하고 조직 치유, 형태 형성의 기능이 있는 것으로 보고된다.^{11,23)} 따라서 osteonectin은 골 개조와 골 형성과정에 성장 조절 요소로 고려된다.¹⁸⁾ 본 연구에서 정상적인 구개골 형성에 osteonectin은 골아세포와 골세포, 간엽조직, 상

피세포모두에서 정도의 차이를 보이면서 발현되었고, 구개파열시 골아세포와 골세포, 간엽조직에서 정상조직에서 발현되는 정도와 차이를 보이면서 발현되었다. 따라서 osteonectin은 골 형태 형성과정에서 어느 정도의 역할을 수행하는 것으로 보고되는데,^{38,39)} Western blot 분석 결과 구개파열 백서의 osteonectin 발현이 정상군의 상악 조직과 비교해서 약하게 발현된 것으로 나타나므로 정상 구개형성에 중간기질의 발현이 필요하리라 사료된다.

구개 형성과정에서 3가지 돌기가 융합과 병합과정에서 상피-간엽 상호관계를 발생과정에서 보인다. 특히 구개돌기의 근심 상피가 융합과 병합 후에 발생학적 예정된 세포자괴사가 보이는데, 이런 관점은 두 가지 관점에서 설명된다.²⁸⁾ 그 한가지는 정중구개부위에서 대식세포와 가수분해효소가 상피파괴에 관여하여 이런 상피 죽음은 대합되는 구개돌기의 근심상피의 유착을 초래한다는 가설^{29,32)}과 다른 한가지는 근심 상피세포가 비강쪽이나 구강쪽으로 이동하여 비강상피나 구강상피로 병합되거나 간엽조직으로 형질전환(transform)된다는 가설^{5,12)}이다. 본 연구에서도 정상구개 형성조직에서 구개돌기와 비돌기 융합부에서 공포(vacule)가 관찰되었는데, 공포를 둘러싼 세포들이 상피세포에서 유래되는지는 확인할 수 없어 어느 학설을 뒷받침할 수 없었다. 정상구개에서 구개돌기 근심상피의 자가죽음(apoptosis)현상에는 TGF- β 와 TGF- β 3, insulin-like growth factor II, acidic & basic fibroblast growth factor가 관련되어 있으며,^{15,36)} 본 연구의 osteonectin도 관련이 있으리라 사료된다. 또한 구개파열백서에서 구개돌기 근심상피의 폭경이 다른 곳의 상피에 비해 좁은 현상이 관찰되었는데, 이런 현상이 세포 형질전환과 관련되어 있는지 아니면 정상적인 분화형태인지에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

임신 9일째 백서 4마리를 구입하여 1마리의 대조군과 3마리의 실험군으로 구분한 후, beta-aminopropionitrile를 임신 13일째 1g/1kg 체중 비율로 실험군에 투여하였다. 그 후 임신 20일째 백서를 모두 희생하여 대조군에서는 12마리, 실험군에서는 33마리의 백서 태자를 얻어 그 중 실험군에서 총 6마리의 구개파열 백서태자를 얻었다. 구개파열백서태자 6마리를 각3마리씩 면역조직화학염색과 Western blot검사를 위해

나누고, 대조군의 구개와 구개파열군의 구개에서 osteonectin 발현양상은 다음과 같은 결과를 보였다.

1. 구개파열 백서의 간엽조직에서 osteonectin 발현 양상은 대조군에 비해 현저히 낮은 형태를 보였다.
2. 구개파열 백서의 골아세포와 골세포에서의 osteonectin 발현 양상은 대조군에 비해 낮은 형태를 보였다.
3. 구개파열 백서의 비강 상피에서 osteonectin 발현 양상은 구개 상피의 발현양상과 차이가 없었다.
4. Western blot분석에서 구개 파열 백서의 osteonectin 밴드 굵기와 두께는 정상군에 비해 얇고 희미하였다.

이상의 결과로 osteonectin은 구개파열 같은 비정상적 골 형태 발생과정에서 marker로 사료되고, 정상 구개 형성에 일정한 osteonectin발현은 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Abbott BD, Pratt RM :Retinoids and EGF after embryonic mouse palatal epithelial and mesenchymal cell differentiation in organ culture. *Journal Craniofacial Genetic Developmental Biology*. 1987 : 7 : 219-40.
2. Balling R, Mutter G, Gruss P, Kessel M :Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression by the homeobox gene. *Cell*. 1989 : 58 : 337-47.
3. Bonner JJ, Slavkin HC :Cleft palate susceptibility linked to histocompatibility-2 in the mouse. *Immunogenetics*. 1975 : 2 : 213-7.
4. Bonner JJ :The H-2 genetic complex, dexamethasone induced cleft palate and other craniofacial anomalies. *Current Topics Developmental Biology*. 1984 : 19 : 193-216.
5. Carette MJM, Ferguson MWJ : The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: an analysis of DiI labeling and confocal microscopy. *Development*. 1992 : 114 : 379-88.
6. Coleman RD: Development of rat palate. *Anatomical Research*. 1965 : 151 : 107-18.
7. Diewert VM : Correlation between alterations in Meckels cartilage and induction of cleft palate with -aminopropionitrile in the rat. *Teratology*. 1981 : 24 : 43-52.
8. Diewert VM, Pratt RM; Selective inhibition of

- mandibular growth and induction of cleft palate by diazo-oxo-norleucine(DON) in the rat. *Teratology*. 1979 : 20 : 37-50.
9. Ferguson MWJ: Palate development. *Development*. 1988 : 103 : 41-60.
 10. Ferguson MWJ: The orofacial region. *Textbook of fetal and perinatal pathology*. London: Blackwell. 1991 : 843-50.
 11. Findlay DM, Fisher LW, McQuillan CI, Termine JD, Young MF: Isolation of the osteonectin gene: Evidence that a variable region of osteonectin molecule is encoded within one exon. *Biochemistry*. 1988 : 27 : 1483-9.
 12. Fitchett JE, Hay ED: Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Development Biology*. 1989 : 131 : 455-74.
 13. Foppreman DM, Sharpe PM, Ferguson MWJ : Comparative biochemistry of mouse and chick secondary palate development in vivo and in vitro with particular emphasis on extracellular matrix molecules and the effects of growth factors on their synthesis. *Archives Oral Biology*. 1991 : 36 : 457-71.
 14. Fraser FC: The genetics of cleft lip and palate. *American Journal Human Genetics*. 1970 : 22 : 336-42.
 15. Hall BK, Sunetra E :Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cell-derivatives. *International Journal Development Biology*. 1991 : 35 : 367-87.
 16. Holland PWH : Homeobox genes and the vertebrate head. *Development*. 1988 : 103S : 17-24.
 17. Jacobsson C, Granström G: Effects of vitamin B6 on beta-aminopropionitrile-induced palatal cleft formation in the rat. *Cleft palate Journal*. 1997 : 34 : 95-100.
 18. Lane TF, Sage EH :The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interaction, *FASEB Journal*. 1994 : 8 : 163-173.
 19. Mason IJ, Murphy D, Mönke M, Francke U, Elliott RW, Hogan BLM: Developmental and transformation sensitive expression of the SPARC gene on mouse chromosome 11. *EMBO Journal*. 1986 : 5 : 1831-37.
 20. Melnick M, Shields ED, Burzynski NJ.: Clinical dysmorphology of orofacial structures. Littleton, MA: PSG Publishing, 1982.
 21. Millard R : Cleft craft: the evolution of its surgery; 1. the unilateral deformity. Little brown and company boston. 1st Edi. 1976 : 3-17.
 22. Montenegro MA, Rojas M, Dominguez S, Rosales CJ: Differences in extracellular matrix components and cell density during normal and dexamethasone-treated 2ndary palate development in two strains of mice with different susceptibility to glucocorticoid induced-clefting. *Journal Craniofacial Genetic Development Biology*, 1998 : 18 : 100-106.
 23. Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heath JK, Hogan BLM : Developmental expression of osteopontin and osteonectin RNA as revealed by in situ hybridization. *Journal Cell Biology*, 1988 : 106 : 441-6.
 24. Pisano MM, Green RM.: Hormone and growth factor involvement in craniofacial development. *IRCS Medical Science*. 1986 : 14 : 635-40.
 25. Pratt RM:Hormones, growth factors and their receptors in normal and abnormal prenatal development. *Teratology*. Plenum Publishing Corp. New York. 1984 : 189-217.
 26. Pratt RM : Role of epidermal growth factor in embryonic development. *Current Topics Development Biology*. 1987 : 22 : 175-193.
 27. Romsberg RW, Ringgs BL: Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium binding proteins. *Biochemistry*. 1986 : 25 : 1176-80.
 28. Saunders JW: Death in embryonic systems. *Science*. 1966 : 154 : 604-12.
 29. Shuler CF, Guo Y, Majumder A, Luo R : Molecular and morphologic changes during the epithelial-mesenchymal transformation of palatal shelf medial edge epithelium in vitro. *International Journal Development Biology*. 1991 : 35 : 323-32.
 30. Slavkin HC: Gene regulation in the development of oral tissues. *Journal Dental Research*. 1988 : 67 : 1142-9.
 31. Slavkin HC: Regulatory issues during early craniofacial development: a summery. *Cleft Palate Journal*. 1991 : 27 : 101-9.
 32. Smiley GR : An in vitro and in vivo study of single palatal processes. *Anatomical record*. 1972 : 173 : 405-16.
 33. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey MI, Martin Gr : Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen. *Cell*. 1981 : 26 : 99-105.
 34. Teruko TY, Teiji T, Yukihiro K, Shintaro N : Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteoclastin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *Journal Histochemistry Cytochemistry*. 1994 : 42 : 885-96.

35. Tung PS, Domenicucci C, Wasi S, Sodek J. :Specific immunohistochemical localization of osteonectin and collagen types I and III in fetal and adult porcine dental tissues. *Journal Histochemistry Cytochemistry*. 1985 : 33 : 531-40.
36. Wahl SM, Hunt DA, Wakerfield L M, McCartney-Francic N, Whal L M, Robert A B, Sporn MB : Transforming growth factor type induces monocyte chemotaxix and growth factor production. *Proceedings of National Academy Sciences USA*. 1987 : 263 : 7646-54.
37. Warkany J: Congenital malformation: notes and comments. Chicago: Year book Medical Publishers: 1971.
38. Wewer UM, Albrechtsen R, Fisher LW, Young M F, Termine JD : Osteonectin in human deciduas and carcinoma tissues characterized by *De Novo* formation of basement memebrene. *American Journal Pathology*. 1988 : 132 : 345-55.
39. Young MF, Bolander ME, Day AA, Ramis CI, Gehron, Robey P, Yamada Y Termine JD : Osteonectin mRNA: distribution in normal and transformed cells. *Nucleic Acids Research*. 1986 : 14 : 4483-47.
40. Ten Cate 저 황성명 외역: 구강조직학, 과학 서적. 2nd Edi. 1996 : 22-24.

-ABSTRACT-

A study of osteonectin expression patterns in BAPN-induced cleft palate formed rats

Ki-Chul Tae, En-Chel Kim, Sun-Kyeong Lee

Department of Orthodontics and Oral Pathology, School of Dentistry, Wonkwang Dental Institute, Wonkwang University

The purpose of this study was to investigate osteonectin expression patterns in cleft palate compare to normal palate rats. We used 4 pregnant rats, and beta-aminopropionitrile was oral dose to rat according to 1g/kg body weight at gestation days 13 to induce cleft palate. Total 6 fetus was got with cleft formed, then 3 fetus was used for immunohistostain and 3 fetus was used for western blot analysis. Expression patterns of osteonectin in mesenchymal cells of cleft palate was more dilute to mesenchymal cells of normal palate with immunohistostain, and width and length of band of maxilla in cleft palate was more thin than maxilla of normal palate with western blot study.

KOREA. J. ORTHOD. 2000 ; 30 : 433-440

※ **Key words** : Cleft palate, Osteonectin, Immunohistostain, Western blot