대치교정지 1996, 26(4) : 359-371

성견의 실험적 치아이동시 치주조직내 DNA 합성에 관한 면역조직화학적 연구

김 성 진[1] · 임 나 원[2] · 김 상 철[3]

교정력에 의한 성견의 치아이동시 발생하는 조직변화 중 치주인대 내에서의 세포활성도의 변화를 교정력의 크기와 기간에 따라 알아 보고자 하였다. 생후 1년 6개월된 성견 6마리를 5마리의 실험군과 1마리의 대조군으로 나누었고 실험군에서 하악 좌측에는 강한 힘(250-300g)을, 하악 우측에는 약한 힘(50-75g)을 제1소구치와 제2소구치 사이에 open coil spring으로써 적용하였다. 실험군의 성견을 각각 12시간, 24시간, 3일, 1주, 2주에 Bromodeoxyuridine(BrdU)을 주입하고 희생시켰다. 하악 제1,2 소구치 부위의 조직을 채득하여 통법에 따라 파라핀 포매하였으며, H & E 염색과 항 BrdU 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

견인측에서의 치주인대 단절과 혈관확장은 12시간째에서 관찰되어 증가하다가 3일째 이후에는 감소되었는데 약한 힘을 준 경우보다 강한 힘을 준 경우에서 더 많았으며 압박측에서의 치주인대의 초자양변성과 파골세포 활성은 12시간째에서부터 관찰되어 3일째까지 증가하다가 7일째부터 감소하였는데 약한 힘을 준 경우보다 강한 힘을 준 경우에서 더 많이 나타났다. 대조군의 BrdU 발현은 구강상피와 치주인대의 섬유모세포에서 주로 많았고 골세포나 파골세포에서는 음성반응을 보였으며 실험군의 BrdU 발현은 압박 측보다 견인측에서 많았으며 치경부쪽보다는 치근단쪽에서 더 많았다. 약한 힘을 준 경우에서는 BrdU 발현이 1일째에 가장 많이 나타나다가 감소되었고 강한 힘을 준 경우에서는 12시간째에서 최고에 달하다가 이후에는 감소되었으나 14일째에는 실험군과 대조군 간에 큰 차이가 없었다.

(주요단어: DNA 합성,치주인대,실험적 치아이동)

I. 서 론

치주조직에의 손상 없이 골조직의 흡수 또는 침착 반응이 일어나는 생리적 골개조(bone remodelling)가 유도되도록 교정력은 적당히 조절되어야 한다.

적용된 교정력에 의해 치아주위조직에 어떠한 영향이 미치는가에 대한 많은 연구가 이루어졌으며 그에 따라 교정력 조절에 대한 많은 지식이 축적되었다.

1) 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 박사과정
2) 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 박사과정
3) 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 교수

1904년 Sandstedt[1]가 처음으로 개를 대상으로 교정적 치아이동의 조직소견에 관하여 연구하기 시작한 이래, Schwartz[2]를 비롯, Oppenheim[3], Storey[4], Reitan[5], Zaki와 Huysen[6], Singer[7], Koumas[8], Buck[9], 국내의 이[10], 임[11] 등에 의하여, 치아를 통해 가해진 교정력이 치주인대에 전달되어, 압박측의 치조골 흡수와 견인측의 골침착이 이루어지는 생체 반응의 기구에 대하여 많은 내용이 밝혀졌다.

힘의 적용량과 적용방식에 있어, Storey[12-15]는, 치아이동 효과를 최대로 높이기 위해서는, 힘의 크기와 적용기간이 최적으로 설정되어야 하며, 이 조건을 벗어나면 조직은 파괴되고 이동량이 감소한다고 하였

으나, Hixon등[16]은 치아 이동 속도와 힘의 크기 간의 관계를 구체적으로 제시할 수 없다고 하였다. Burstone[17]은 치아 이동속도와 힘의 크기 간의 관계가 복잡함을 지적하고 흡수와 침착의 기전을 보다 잘 이해할 필요성이 있다고 하였다.

교정적 치아 이동시 치주인대의 모세혈관이 치주조직의 개조나 완충 작용에 관여하는 것으로 알려져 있으며[18], 치아 이동시의 치주인대나 치수의 혈관 변화에 대해서도 다수 연구되어 왔다[19-23].

Davidovitch등[24]과 Norton등[25]은 골개조 반응을 생화학적 그리고 세포 생물학적으로 규명하기 위한 시도를 행하였다. 세포활성도에 대한 연구는, 자기방사법이 도입되면서 많은 발전을 해왔으며, 특히 1951년 Fitzgerald등[26]에 의해 tritiated thymidine ([^{3}H])이 소개되면서 고해상력의 자기방사법이 적극 응용되었다. 따라서, Owen[27-29], Kember[30], Roberts등[31-33], Tayer등[34], Baumrind 와 Buck[35], Kvam[36], Yee등[37] 그리고 Southard와 Forbes[38] 등의 세포동역학(cell kinetics) 연구가 가능하게 되었다. 즉 DNA 합성기 과정에 있는 세포를 추적 또는 표지할 수 있어 그 세포수를 계측함으로써 DNA 합성능을 평가하는 것이다.

또한 근래에는 유식세포계측기를 이용하여 DNA의 분포 및 양을 측정하는 방법이 개발되었으나[39-41], DNA 합성 세포의 위치를 정확히 알 수 없다는 단점이 있다.

이러한 단점을 보완하여 면역조직화학적방법이 개발되었으며, 대표적인 것으로 halopyrimidine 계열의 Bromodeoxyuridine (BrdU)을 사용하여 개개세포의 DNA 합성능을 측정할 수 있는 방법이 있다. Thymidine의 동족체인 BrdU가 DNA 합성이 활발한 세포의 DNA 나선에 들어가 불안정한 수소결합을 이루게 한 후, 면역조직화학적 방법으로 DNA 나선을 푼 다음 항-BrdU 항체를 이용하여 염색하면 BrdU와 결합한 DNA가 있는 세포의 위치를 찾아낼 수 있어, DNA 합성이 활발한 세포를 인지할 수 있는 것이다. 이러한 방법은 Gratzer[41]에 의해 개발되었으며, 그후 DNA 합성세포를 추정하는데 있어, 자기방사선법의 결과보다 우수하다고 보고하였다[42,43].

교정력에 의한 치아이동시의 골개조 현상에 대한 추적이 여러 방향으로 시도되고 있으나 골침착 및 흡수과정을 활성화 시키고 조절하는데 관여하는 세포기구에 관해서는 아직 논란이 많은 실정이다.

이에 본 연구에서는, 교정력에 의한 성견의 치아이동시 발생하는 조직변화 중 교정력의 크기와 기간에 따른 치주조직내 세포 활성도의 변화를 알아보기 위하여, 세포의 증식을 인지하는 항체를 사용하여 면역조직화학적 방법으로 DNA의 합성 정도를 파악하여 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1) 실험재료

체중 20kg 내외의 생후 1년 6개월된 성견 6마리를 일정 조건하의 실험실에서 2주간 사육한 후 대조군 1마리와 실험군 5마리로 나누었다. 실험군에서는 하악 제 1,2 소구치 사이에 open coil spring을 장착해서 좌측에는 강한 힘(250-300g), 우측에는 약한 힘(50-75g)이 가해지도록 하였다. 그후 연성사료로 계속 사육하였으며, 12시간, 24시간, 3일, 1주, 2주에 각각 희생시켰다.

2) 실험방법

가) spring 장착 (Fig. 1)

Coil spring을 적당히 잘라 tension gauge를 이용하여 힘(50-75g, 250-300g)의 크기를 확인하였다. 2% 염산 xylazine (Rompun®;한국바이엘)을 성견 둔부에 체중 10kg당 1.5ml씩 주입하여 진정시킨 후,하악 제 1,2 소구치에 교정용 브라켓을 직접 접착하고 교정용 호선에 삽입된 coil spring을 장착하였다.

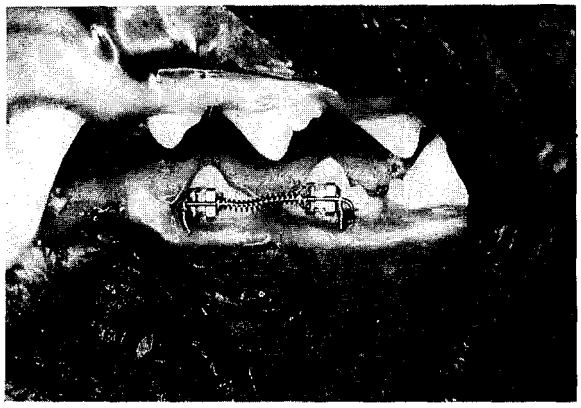

Fig. 1. The coil spring in place on themandibular premolars of dog

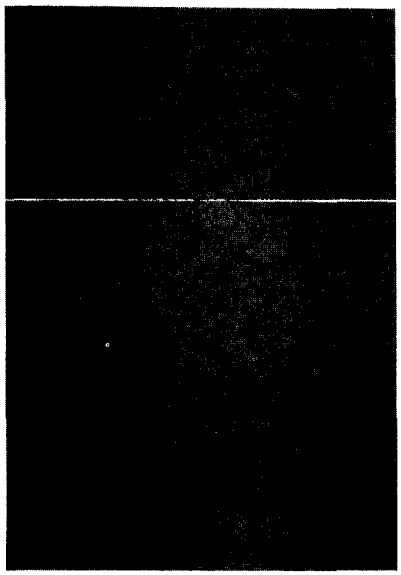

Fig. 2. Microphotography of periodontal ligament in control tissue. Periodontal ligament (P), Cementum (C), Alveolar bone (A), (H & E, X 40)

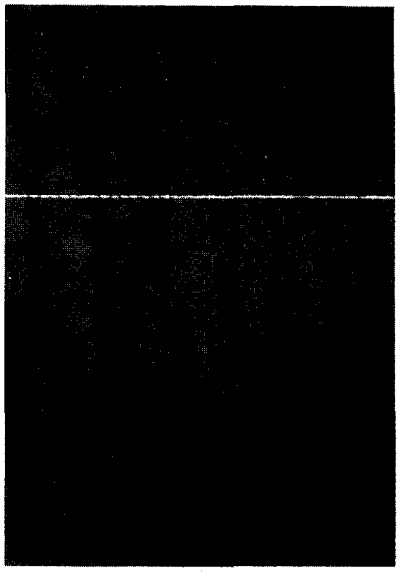

Fig. 3. Microphotography of 12 hours in light force group(50-75g force group) shows bone resorption by osteoclasts(arrow-indicated). (H & E, X 100)

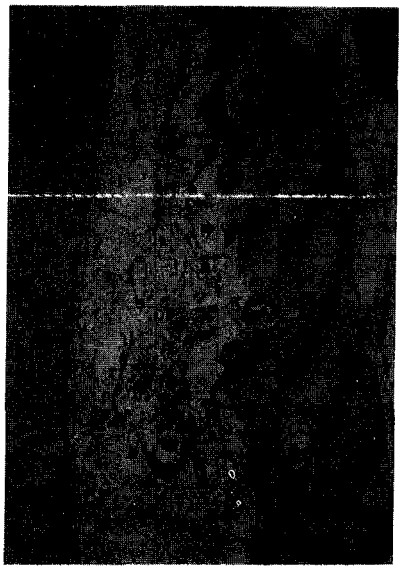

Fig. 4. Microphotography of 12 hours in heavy force group(250-300g force group) shows more destructive(arrow-indicated) than that in light force group. (H & E, X 200)

나) Bromodeoxyuridine(BrdU) 주사 및 고정액 주입

10μM/gm BrdU(Sigma, U.S.A.)을 Phosphate buffer saline에 용해하여 희생시키기 1시간 전에 마리당 50mg씩 정맥주사하였으며, 고정액으로써 4% paraformaldehyde를 caccodylate buffer에 녹여 외경동맥에 압박 주입하며 희생시켰다.

다) 광학현미경 표본 및 조직학적 염색

동물을 희생시키고 10% 중성 포르말린에 3일간 더 고정하였다. 자기탈회기를 이용하여10% EDTA와 5% Nitric acid를 1:1로 섞은 용액에 1주일간 탈회시킨 후, 파라핀 포매하여 치아 장축방향으로 절단하여 4-6μm의 박절표본을 poly-L-lysine을 도포한 슬라이드에 부착하였으며 Hematoxylin & Eosin 염색을 시행하였다.

라)면역조직화학염색

LSAB(labelled streptavidine biotin)법으로 염색을 시행하였는데 일차항체는 anti-bromodeoxyuridine(Dako, USA)을 이용하였고 발색은 DAB (diaminobenzidine kit)을 이용하였다.

염색순서는 먼저 파라핀 절편을 탈파라핀화 및 수화시킨 후 3% H^2O^2에 5분간 처리하고 10mM의 PBS (phosphate buffer saline)에 세척하였다. DNA 나선을 풀기위해 1N Hcl에 60° C 에서 10분간 처리한 후 다시 10mM 붕산에 1분간 처리하고 PBS로 세척하였디. 비특이적 결합을 방지하기 위한 차단항체로 20분간 처리하고 제1차 항체인 항 Bromodeoxyuridine을 1:150으로 희석해 40분간 처리한후 PBS 로 세척후 제2항체인 anti-mouse Ig G(Vector Lab)를 30분간 부란시켰다. H_2O_2를 함유한 0.02% DAB로 발색시킨 후 Harrison hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerin 도포 후 검경하였다.

III. 실험 성적

가. 대조군

양 소구치 사이의 치간유두는 5-6층의 편평상피로 덮혀 있었으며, 정상적인 치주인대 섬유배열을 이루고 있었고, 치주인대 간격은 근원심 양측이 같았고 골흡수는 관찰되지 않았으며 치조골면에서는 규칙적인 조골세포가 배열되어 있었다(Fig.2).

Fig. 5. Microphotography of 24 hours in heavy force group discloses active osteoblasts (arrow-indicated) in tension side (H & E, X 100)

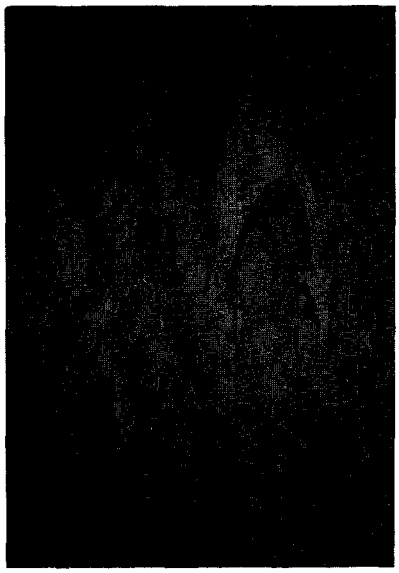

Fig. 6. Microphotography of 3 days in heavy force group shows marked widening of periodontal ligament spaces(arrow-indicated) at tension side (H & E, X 40)

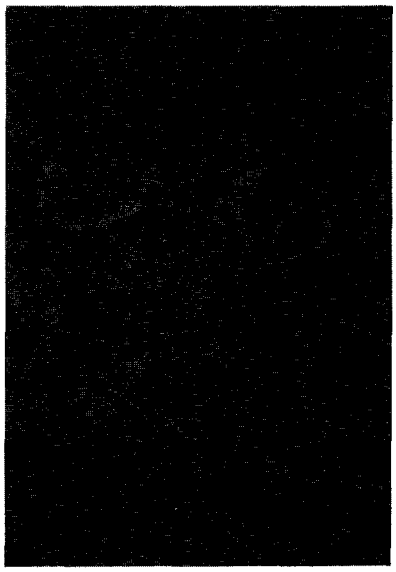

Fig. 7. Microphotography of 3 days in heavy force group reveals bone resorption by osteoclsts(arrow-indicated) at pressure side. (H & E, X 200)

Table 1. Histopathologic Findings in Tension Side of Periodontal ligament according to Degree and Duration of Applied Force

	tearing of PDL		osteoblastic activity		vascular dilatation	
	Low	High	Low	High	Low	High
control	-		+-		-	
12hrs	+	++	+-	+	+-	+
24hrs	++	+++	+	++	+	++
3days	++	+++	++	+++	++	+++
7days	+	++	+	+	+	++
14days	+-	+-	+-	+-	+-	+

(-; negative, +-; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe)

나. 견인측 치주조직변화 (Table 1)

1) 약한 힘을 준 경우 (50-75g)

12시간째에는 치주인대가 무질서하게 배열되어 있었고, 경도의 혈액유출이 관찰되었으며 신생골 형성은 관찰되지 않았으나 조골세포는 대조군에 비해 증가되어 있었다.

1일째에는 12시간째보다 견인측 치주인대 간격이 넓어지면서 치주인대의 무질서함이 증가되었으며 조골세포의 활성은 증가되었으나 신생골 형성은 뚜렷하지 않았다.

3일째에는 치근단에 모세혈관 파열및 확장이 증가되고 조골세포의 활성은 1일에 비해 증가되었다.

7일째에는 조골세포 활성증가로 신생골 형성이 관찰되었고 치근단 부위의 혈관의 충혈 및 혈액유출이 관찰되었으며(Fig.8), 14일째에는 치주인대 간격의 확대가 유지되면서 치주인대 섬유배열이 대조군과 유사해졌다(Fig.9).

2) 강한 힘을 준 경우 (250-300g)

12시간째에는 치주인대 섬유의 배열이 약한 힘을 준 경우보다 불규칙하였으나 조골세포의 활성은 약간 더 많은 양상을 보였다.

1일째에는 치주인대의 파열은 약한 힘을 준 경우에 비해 증가된 양상으로 섬유의 배열이 흩어져 있었으며 조골세포의 활성은 약한 힘을 준 경우에 비해 증가되었다(Fig.5).

3일째에는 견인부의 치주인대폭경이 1일째에 비해

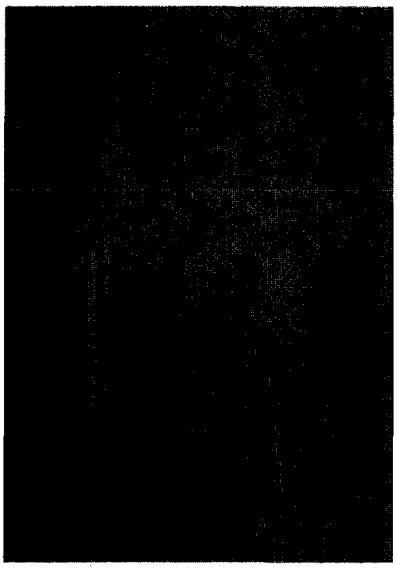

Fig. 8. Microphotography of 1 week in light force group shows tearing of periodontal ligament(arrow-indicated) at tension side. (H & E, X 40)

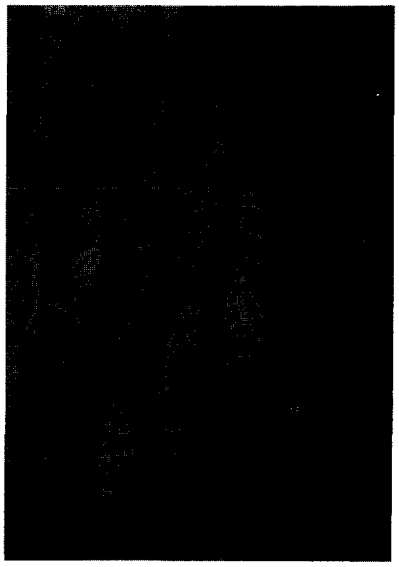

Fig. 9. Microphotography of 2 weeks in light force group shows recovering of periodntal ligament(arrow-indicated) at tension side. (H & E, X 100)

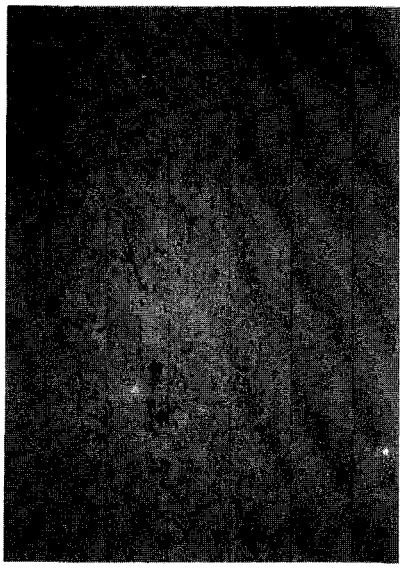

Fig.10. Microphotography of control tissue shows negative distribution around periodontal area(arrow-indicated) (Immunostain of BrdU, X 40)

증가되고 조골세포가 증가된 양상을 보였으며 치주인대 혈관의 충혈및 혈액유출이 제일 많이 관찰되었다(Fig.6).

7일째에는 치주인대 주위의 염증세포 침윤및 충혈은 3일째에 비해 크게 감소되어 약한 힘을 준 경우와 큰 차이가 없었고 치주인대 파열과 조골세포 활성이 3일째에 비해 크게 감소되었으며, 14일째에는 약한 힘을 준 경우와 큰 차이가 없었다.

다. 압박측 치주조직 변화 (Table 2)

1) 약한 힘을 준 경우 (50-75g)

12시간째에는 치주인대 간격이 좁아졌고 중등도의 치조골 흡수가 파골세포에 의해 이루어졌고(Fig.3), 초자양변성은 미약하게 관찰되었다.

1일째에는 치주인대 간격이 더욱 넓어졌고 모세혈관 증식및 치조골 흡수상태가 12시간째에 비해 많이 나타났으며 초자양변성이 12시간에 비해 증가되었다.

3일째에는 파골세포에 의한 치조골 흡수가 최대로 나타났고 치주인대 섬유배열의 무질서함과 폭경 감소가 현저히 나타났고 초자양변성도 크게 감소되었다.

7일째에는 치주인대가 회복되기 시작하였으나 아직 무질서함이 관찰되며 골흡수상은 3일째에 비해 현저히 감소되었고 14일째에는 치주인대 간격의 감소가 현저히 나타났고 치주인대 섬유의 재배열로 대조군과 큰 차이가 없었으며 치조골 흡수는 거의 사라졌다.

Table 2. Histopathologic Findings in Pressure Side of Periodontal ligament according to Degree and Duration of Applied Force

	Hyalinization of PDL		osteoclastic activity		capillary proliferation	
	Low Force	High	Low	High	Low	High
control	-		+-		-	
12hrs	+	++	++	+	+-	+
24hrs	++	+++	++	+++	+	++
3days	+-	+++	+++	+++	++	+++
7days	+-	+-	+	+	+	++
14days	+-	+-	+-	+-	+-	+

(-; negative, +-; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe)

2) 강한 힘을 준 경우 (250-300g)

12시간째에는 약한 힘을 준 경우에 비해 약간 많은

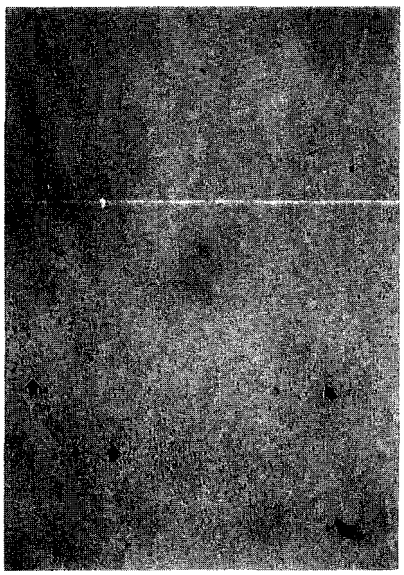

Fig.11. Microphotography of 12 hours in heavy force group shows more positive expression of BrdU(arrow-indicated) in tensin side than that in pressure side, and more in apical area than in cervical area. (Immunostain of BrdU, X 40)

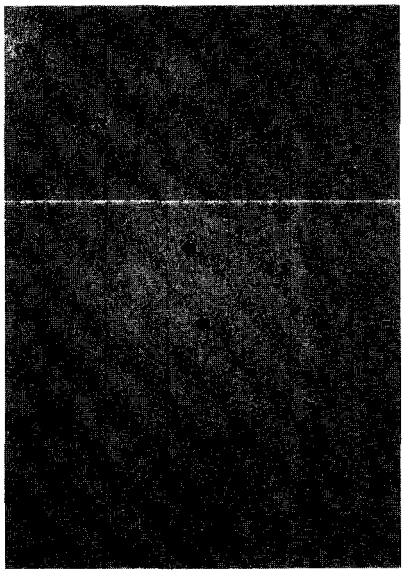

Fig.12. Microphotography of 12 hours in heavy force group at pressure side shows rare expression(arrow-indicated) (Immunostain of BrdU, X 100)

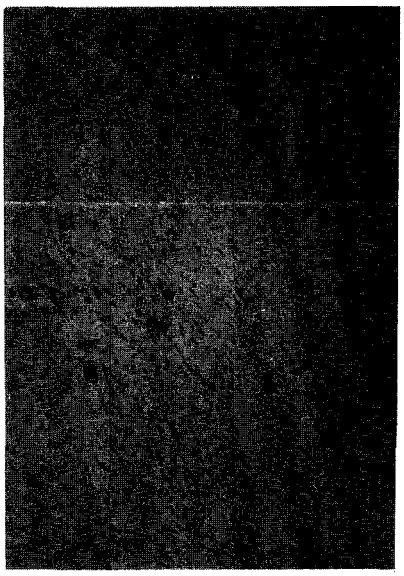

Fig.13. Microphotography of 12 hours in heavy force group shows more psitive expression of BrdU(arrow-indicated) in tension side. (Immunostain of BrdU, X 100)

Table 3. The Expression of BrdU in Periodontal ligament of Control and Experimental Group at Pressure Side

	Light Force			Heavy Force		
	Cervical	Middle	Apical	Cervical	Middle	Apical
control	+-	+-	+-	+-	+-	+-
12hrs	+-	+	+/++	+-	+	++/+++
24hrs	+-	++	++	+-	+-	++
3days	+-	+-	+/++	+-	+-	+
7days	+-	+-	+	+-	+-	+-
14days	+-	+-	+-	+-	+-	+-

(-; negative, +-; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe)

Table 4. The Expression of BrdU in Periodontal ligament of Control and Experimental Group at Tension Side

	Light Force			Heavy Force		
	Cervical	Middle	Apical	Cervical	Middle	Apical
control	+-	+-	+-	+-	+-	+-
12hrs	+-	+	+	+-	++	+++
24hrs	+-	++	+++	+-	+	++
3days	+-	+-	+	+-	+-	+
7days	+-	+-	+	+-	+-	+
14days	+-	+-	+-	+-	+-	+-

(-; negative, +-; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe)

증식 및 염증세포 침윤이 나타났으며 초자양변성도 다소 많았으나(Fig.4), 파골세포의 수는 상대적으로 적었다.

1일째에는 12시간째보다 유출된 혈액과 염증세포 침윤이 많이 나타났고 파골세포의 활성은 증가하여 골흡수가 심하게 나타났다.

3일째에도 치근단에는 유출된 혈액이 잔존되었고 파골세포의 증식이 두드러져 있어 약한 힘을 준 경우보다 현저하였고(Fig.7), 치주인대의 재생은 미약하였으며 초자양변성도 약한힘을 준군보다 현저히 많이 나타났다.

7일째에는 치주인대의 재생이 나타나기 시작하였으며 염증 및 초자양변성은 거의 사라지고 모세혈관 증식, 울혈소견이 현저히 감소되어 있고 골흡수도 감

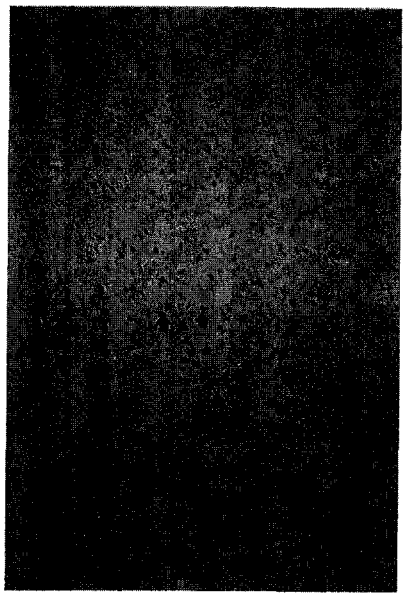

Fig.14. Microphotography of 12 hours in heavy force group shows more expression in periapical area(arrow-indicated). (Immunostain of BrdU, X 100)

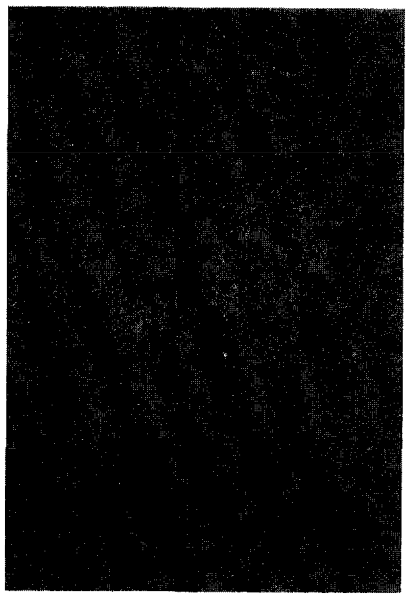

Fig.15. High-power magnification of tension side of Fig.13. Positive expressin of BrdU in periodontal fibers(arrow-indicated) were seen. (Immunostain of BrdU, X 100)

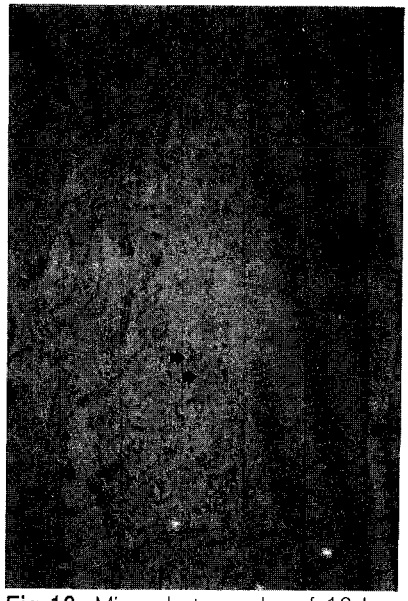

Fig.16. Microphotography of 12 hours in light force group shows mild expression of BrdU in periodontal ligament (arrow-indicated). (Immunostain of BrdU, X 40)

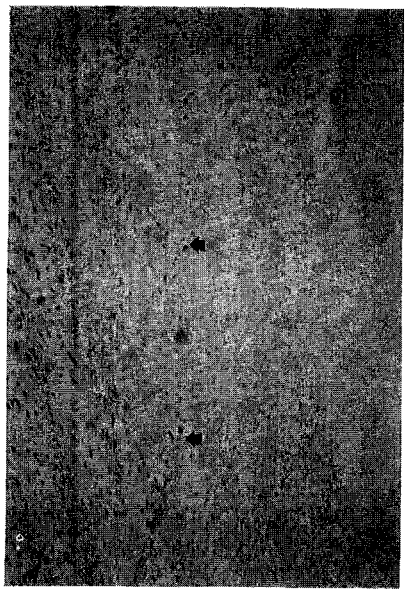

Fig.17. Microphotography of 24 hours in light force group shows more expression than that of 12 hours(arrow-indicated) at tension side. (Immunostain of BrdU, X 100)

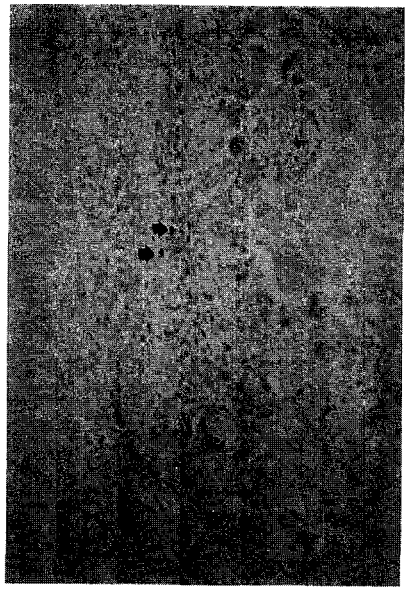

Fig.18. Microphotography of 3 days in light force group shows decreased BrdU expression (arrow-indicated) comparing that of 1 day. (Immunostain of BrdU, X 100)

소되었으나 잔존되어 있었다.

14일째에는 거의 대조군과 큰 차이 없이 많은 재생이 관찰되었다.

라. BrdU 의 발현 (Table 3,4)

대조군은 모든 치주조직에서 미만성으로 경미한 발색 반응을 보였는데, 특히 구강상피 에서 많이 나타나고, 치주조직에서 미약한 반응을 보였으나, 치조골 내부와 파골세포및 조골세포에서는 거의 음성반응을 보였다(Fig.10).

실험군의 12시간째에는 BrdU의 염색정도가 견인측의 치주인대에서 압박측보다 많이 나타났고, 치경부쪽보다는 치근단쪽에서 보다 많은 발색을 나타냈으나(Fig.11,12), 조골세포, 골원세포 등에서는 거의 음성반응을 보였다. 또한 약한 힘을 준 경우보다 강한 힘을 준 경우에

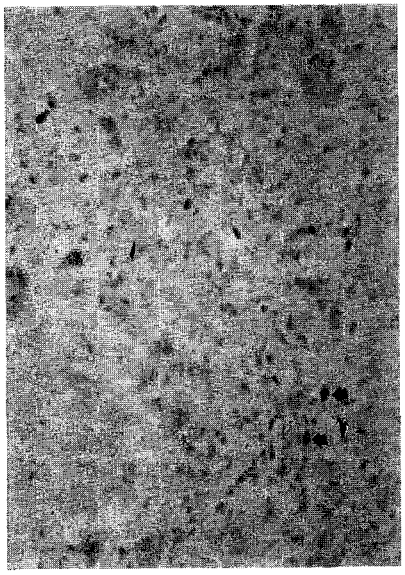

Fig.19. Microphotography of 3 days in heavy force group. High-power magnification of Fig. 18. (Immunostain of BrdU, X 100)

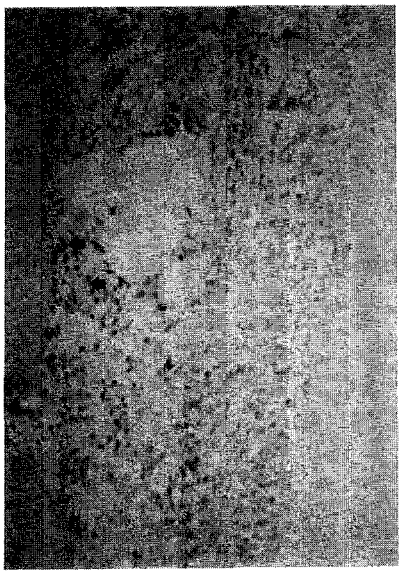

Fig.20. Microphotography of 1 week in light force group shows decreased BrdU expression(arrow-indicated) at tension side comparing that of 3 days. (Immunostain of BrdU, X 100)

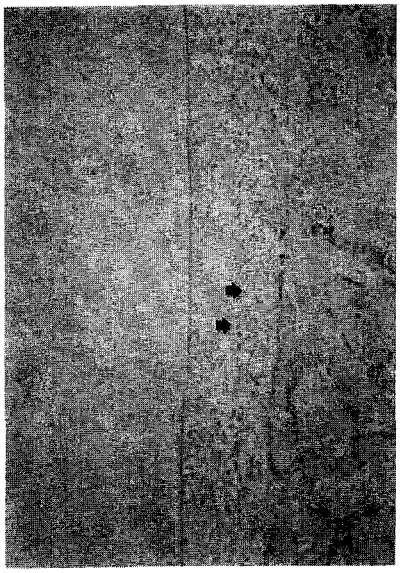

Fig.21. Microphotography of 2weeks in light force group shows rare BrdU expression (arrow-indicated).(Immunostain of BrdU, X 40)

서 보다 많은 양성 반응을 보였다(Fig.13,14,15,16).

1일째에서는 약한 힘을 준 경우의 12시간째보다 더 많은 심도의 반응을 보였으나 강한 힘을 준 경우는 오히려 감소되었는데 주로 치주인대내의 섬유모세포에서 많은 발색을 나타냈고 조골세포에도 양성 반응이 나타나기 시작하였다(Fig.17).

3일째에는 약한 힘을 준 경우와 강한 힘을 준 경우 모두에서 1일째보다 발현이 감소되었는데(Fig.18), 주로 치근단에서 양성반응이 압박측과 견인측 차이없이 잔존되었다(Fig.19). 7일째와 14일째에서는 이러한 발색반응은 크게 감소되어 대조군과 큰 차이없이 치주인대내에서만 경미한 반응을 보였다(Fig.20,21).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

교정력에 의한 치조골의 반응은 생리적인 골개조에서 관찰되는 소견과 유사한 것으로 여겨지고 있어 골개조과정의 활성화는 수시간내에 이루어지며 흡수는 한달간 계속되고 다양한 반전기를 거친 다음에 골형성이 2달에서 3달까지 지속된다고 한다[33]. Reitan 등[5]은 교정력이 가해진 지 수 시간내에 파골세포의 수가 증가되며 교정력을 제거한 후에도 쥐에서는 수일, 사람에서는 10일까지도 파골세포가 잔존한다고 하였다. 또한 Miura등[44]은 치아이동 12시간째에 압박측에서 파골세포가 나타나서 7일간 존재하며 골흡수는 21일까지 지속되고 골첨가는 21일부터 시작한다고 하였다. 본 연구에서는 강한 힘과 약한 힘 모두 12시간째에 나타나서 약한 힘의 경우 12시간째에 가장 많았고 이후 24시간째에는 강한 힘의 경우에 많아져서 3일째에는 최고조에 달하다가 7일째까지 잔존되었으나 이후에는 미미한 양상을 보여 Miura등의 연구와 유사한 소견을 보였다.

교정력의 크기와 기간에 관한 연구에서, Storey[4]는, 약한 힘을 가할 경우 견인측에는 혈액순환이 증가하여 조골세포의 수와 크기가 증가하며 새로운 골조직이 형성되나, 지나치게 강한 힘은 골형성을 억제하거나 지연시킬 수 있다고 하였다. Aisenberg[45]는 강한 힘을 가하면 힘의 방향으로 골소주가 형성되고, 약한 힘의 경우에는 치조골 전반에 걸쳐 신생골이 형성되므로 고정기간이 단축된다고 하였으며, Ackerman등[46]은 신생골의 형성은 힘의 크기보다는 기간에 더 관계가 있다고 하였다. 또한 Southard와 Forbes[38]의 경

우에도 힘의 차이에 따른 골침착량의 차이는 없다고 하였고 Storey[4]는, 강한 힘에서는 골세포의 간격이 적고 광질화가 덜 된다고 하였으나 본 연구에서는 실험 7일 이후에는 조골세포 활성도에서 차이가 없어서 Southard와 Forbes[38]의 결과와 유사하였다.

Macapantan등[47]은 교정력을 받은 압박측 치주인대에 초자양변성이 초래된다고 하였으며, Kvam등[36]도 광범위한 초자양변성은 치아이동을 저지시키며 치근흡수를 초래할 수 있다고 주장하였으며, 치주인대에 초자양변성이 일어나는 현상은 교원섬유의 분해와 불규칙한 배열에 의한 것이라고 하였다, Reitan[5]은 초자양변성 부위에 대한 H & E 염색에서 교원섬유가 주위의 기질과 융합된 것으로 관찰되나 위상차 현미경에서는 교원섬유가 변질되지 않은 소견을 보인다고 하였다.

압박측 치주인대에서의 초기세포변화에 대하여, 교정력을 받은지 1시간 후에 또는 교정력을 받은지 6시간 후에, 섬유모세포의 핵농축을 보고하여 세포의 변성과 괴사가 세포핵으로부터 일어나기 시작하였음을 보고하였다[6]. 초자양변성이 일어나는 시기에 대하여, 인간에서는 교정력을 가한 지 30-40시간, 백서에서는 6시간 후에, 또는 3-6시간후에 관찰된다고 하였다[5,6]. 압박측 치주인대의 초자양변성은 사용한 교정력의 크기에 관계없이 발생하며 교정력이 약해지면 변성범위가 좁고, 실험동물의 치조골 치밀도가 높을수록 빨리, 넓게 초자양변성이 발생한다고 하였다[5]. 본 연구에서는 실험군 모두 12시간째에 관찰되기 시작하여 약한 힘은 1일째까지, 강한 힘은 3일째까지 증가 또는 지속되다가 3일째 이후에는 모두 크게 감소하는 경향을 보였다, 강한 힘에 의해 초자양변성이 초래되면 치아이동이 저지되고 시간이 경과함에 따라 초자양변성된 부위의 인접 치조골이 제거됨으로써 치아이동이 이루어지지만 초자양변성 부위가 넓을수록 골흡수가 늦게 일어나 치아이동이 늦게 일어나므로 교정시술시 가능하면 지속적인 약한 힘을 적용하는 것이 이상적이라고 사료된다.

본 연구에서는 14일간 교정력을 성견에 적용하여 견인측과 압박측의 치주조직 변화를 관찰한 결과, 강한 힘의 경우가 약한 힘의 경우보다 골흡수 소견이나 파괴양상을 더 많이 관찰할 수 있었으나 이후 14일째에는 힘의 크기에 관계없이 치주인대 회복의 소견이 보이기 시작하였다. 그러나 보다 완전한 평가는 장기적인 관찰에 의해 가능하리라 사료된다.

세포동역학적 연구는 세포의 성장을 이해하고 생물학적 활성도를 연구하여 임상적으로 효과적인 치료계획과 예후관찰에 도움을 준다. 세포증식율 측정 방법에는 세포분열지수를 구하거나 특별한 DNA 전구물질의 전체적인 흡수력을 측정하거나, 특이한 DNA 전구물질에 혼합되는 세포를 세거나, 증식과 관련된 효소 또는 항체를 포함하는 세포를 측정하는 방법이 있다. 이런 유식세포계측과 세포형광계측연구방법은 DNA ploidy와 S-기에 존재하는 세포의 비율을 알수 있으나 이배수체성을 결정하는데 어려움이 있고 형태학적 특징과 조직학적 소견을 관찰할 수 없는 단점이 있다고 하였다[40]. 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 최근에 BrdU를 응용한 면역조직화학적 방법이 개발되었는데 이는 방사선 동위원소가 아니고 인체내의 연구시 골수에 무해하므로 세포의 동역학 연구에 널리 사용될 수 있다. 세포복제율의 변화는 DNA 생산율을 분석함으로써 추정할 수 있으며 일반적 대사능의 변화는 RNA 생산율을 분석함으로써, 섬유생산율 변화는 교원질합성율의 변화를 분석함으로써 추적할수 있다. 본 연구에서는 thymidine을 실험동물에 주입함으로써 가능한 자기방사법적 표지율 추적 방법 대신 bromodeoxyuridine을 주입함으로써 면역조직화학적 방법으로 DNA 합성능을 상대적 정도로 판정하였다.

본 연구의 결과 대조군 치은상피의 DNA 합성세포가 대부분 기저층에 분포하였다. 실험군의 상피에서도 기저층과 부기저층에 주로 분포하여 DNA 합성세포의 분포변화와 증식대의 이동이 약간 일어났으나 힘의 크기에 따른 BrdU 표지 정도의 차이는 상피에서 볼 수 없었다. 또한 대조군의 BrdU 발현은 치주인대의 섬유모세포에서 주로 발현되었고 치수나 골세포, 조골세포, 파골세포에서는 거의 음성반응을 보였다.

Kvam[36]은 백서 상악 제1대구치를 측방이동시켰을 때, thymidine 표지가 처음엔 압박측 초자양변성 주위 세포에서 증가되다가 나중에는 초자양변성 부위로 침범하는 세포들에서 표지되었다고 하였고, thymidine에 표지된 핵을 가진 파골세포가 1, 2, 3, 4, 6, 7일에 관찰되었고 조골세포 및 섬유아세포에 주로 표지된다고 하였다. 본 연구에서는 BrdU 표지된 파골세포가 대조군과 초기 및 중기인 7일째까지는 관찰되지 않다가 2주째에나 관찰되었는데 이는 대식세포 또는 단핵전구세포들이 활성화되어 이들의 융합에 의해 파골세포가 형성되기에는 어느 정도의 시간이 필요하기 때문인 것으로 여겨진다.

Southard와 Forbes[38]에 따르면 백서 구개봉합을 helical spring으로 확장시킨 thymidine labelling 연구에서 성견의 동시성 변화가 형태학적으로 일어나며 DNA합성 중의 세포수에서도 일어나는데 개체간의 변이는 거의 없었다고 하였다. 장력을 가한지 24시간째에서 thymidine labelling index가 최고조에 달해 Roberts[32-34]의 연구와 일치하였다고 하였는데, 대조군의 경우 1.4%에 달한 반면, 실험군은 치주인대에 교정력을 가한지 24시간에 25.2% 까지 증가하였다고 하였다. 백서 구개봉합에 장력을 가한 경우도 대조군은 0.4%의 thymidine labelling index를 보인 반면 약한 힘은(50-75g)은 1일째에 14.6%에 달하다가 점점 감소되어 4일째에는 4.2% 정도로 줄었고 강한 힘은 (250-300g)은 실험 1일째에 가장 높은 17 .5% 를 보이다가 2일째부터는 4.5% 정도로 월등히 감소된 소견을 보였다고 하였다. 본 연구에서는 대조군의 표지 정도가 0.2% 정도에 달하였고 강한힘을 가한 12시간대에는 약 15% 정도에 달하여서 선학들의 연구와 어느정도 일치하였으나 주관성 배제나 관찰자 간의 변이 등을 고려하여 절대적인 수치로 표시하지는 않았다.

Baserga등[48]은 일반적으로 S-기가 전체 총세포주기의 1/3 에서 1/2을 차지하는 것이 보통이며 BrdU 표지지수는 S-기 분율과 비례한다고 하였다. 세포증식이 증가하고 BrdU 표지지수가 증가하면 S-기 기간은 동일하므로 G1-기에 있는 세포의 이동이 빨라져 전체적으로 세포주기의 시간이 빨라진다고 하였다. 일반적으로 G1-기가 유동적이므로 이에 따라 세포주기 시간이 변하기 때문에 짧은 세포주기를 갖는 증식이 빠른 세포는 S-기가 세포주기에 비례적으로 많은 부분을 차지하여 높은 S-기 분율의 순환집단의 수가 증가한다고 하였다. 본 연구에서 약한 힘을 준 경우에서는 BrdU 염색이 1일째에 가장 많이 나타나다가 이후 감소되었고 강한 힘을 준 경우에서는 12시간째에서 최고조에 달하다가 이후에는 감소되었고 실험군 모두 14일째에는 대조군과 큰 차이가 없었는데 약한 힘을 가한 경우에서는 1일째에, 강한 힘을 가한 경우에서는 12시간째에 높은 BrdU 표지지수와 S-기 분율을 보여 힘을 가한 초기에 비정상적인 DNA 합성이 많아지고 G1-기에 있는 세포의 이동이 빨라져 이 기간에 활발한 DNA 합성세포의 증식이 있었음을 추측할 수 있었다.

이러한 BrdU 이외에는 Ki-67을 이용한 단일클론 항체를 이용하는 방법이 있는데 이는 호지킨씨 림프종이 기원인 L428세포에서 추출한 핵단편을 생쥐에 주입시켜 면역화시켜 얻은 항체로 휴면기를 제외한 증식성 세포에 사람의 핵 항체와 반응하는 것으로 알려져 Ki-67을 이용하여 신선한 조직을 면역조직화학적 염색을 하면 G0-기를 제외한 G1, S, G2, M-기에 있는 세포의 핵과 반응하기 때문에 세포의 증식성을 알수 있으나 본 연구에서는 이용되지 못하였다[49]. 또한 PCNA(prolieferating cell nuclear antigen)에 대한 항체를 이용하여 G1-기 후기와 S-기 전기에 있는 세포를 측정할 수 있는 방법이 있다. 이런 PCNA는 36 KD 핵단백으로 S-기에 있는 세포와 반응하기 때문에 조직을 PCNA 항체를 이용한 면역조직화학적 방법으로 염색하면 S-기 세포를 인지할 수 있다고 하였다[50].

본 연구에서는 교정력을 가한 실험군의 BrdU 발현은 압박측보다 견인측에서 많았으며 치경부쪽보다는 치근단쪽에서 더 많았는데 증가된 세포활성에 따라 BrdU 친화력 증가 및 세포합성 증가가 있었기 때문으로 사료되며 교정력의 적용에 따른 조직의 적응과정의 일환으로 압박측의 골흡수기전, 견인측의 골형성기전을 통한 골재형성에 관계되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 치주인대내의 세포에 BrdU 양성세포가 표지됨은 세포분열이 왕성함을 의미한다고 할 수 있으며 치근단에서 보다 많은 BrdU의 발현이 나타났던 점은 치근단쪽의 세포분열이 치경부 쪽보다 계속되는 치아발육으로 인해 더 많이 나타나기 때문으로 사료된다.

본 연구에서는 교정력에 따른 치주조직의 변화와 BrdU의 염색을 통한 DNA 합성세포에 관해 주로 연구되었으나 향후 골기질에 가해지는 골개조의 신호파악 및 분자생물학적 접근이 이루어져야 한다고 사료된다.

V. 결 론

교정력에 의한 성견의 치아이동시 발생하는 조직변화 중 치주인대 내에서의 세포활성도의 변화를 교정력의 크기와 기간에 따라 알아 보고자 하였다. 생후 1년 6개월된 성견 6마리를 5마리의 실험군과 1마리의 대조군으로 나누었고 실험군에서 하악 좌측에는 강한 힘(250-300g)을, 하악 우측에는 약한 힘(50-75g)을 제1소구치와 제2소구치 사이에 open coil spring으로써 적용하였다. 실험군의 성견을 각각 12시간, 24시간, 3일, 1주, 2주에 Bromodeoxyuridine(BrdU)을 주

입하고 희생시켰다. 하악 제1,2 소구치 부위의 조직을 채득하여 통법에 따라 파라핀 포매하였으며, H & E 염색과 항 BrdU 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 견인측에서의 치주인대 단절과 혈관확장은 12시간째에서 관찰되어 증가하다가 3일째 이후에는 감소되었는데 약한 힘을 준 경우보다 강한 힘을 준 경우에서 더 많았다.
2. 압박측에서의 치주인대의 초자양변성과 파골세포 활성은 12시간째에서부터 관찰되어 3일째까지 증가하다가 7일째부터 감소하였는데 약한 힘을 준 경우보다 강한 힘을 준 경우에서 더 많이 나타났다.
3. 대조군의 BrdU 발현은 구강상피와 치주인대의 섬유모세포에서 주로 많았고 골세포나 파골세포에서는 음성반응을 보였다.
4. 실험군의 BrdU 발현은 압박측보다 견인측에서 많았으며 치경부쪽보다는 치근단쪽에서 더 많았다.
5. 약한 힘을 준 경우에서는 BrdU 발현이 1일째에 가장 많이 나타나다가 이후 감소되었고 강한 힘을 준 경우에서는 12시간째에서 최고에 달하다가 이후에는 감소되었으나 14일째에는 실험군과 대조군 간에 큰 차이가 없었다.

참 고 문 헌

1. Sandstedt,C.: Einige Beitrage zur Theorie der Zahnregulierrung, 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, 1936.
4. Storey,E.: Bone changes associated with tooth movement, Aust. J. Dent., 59:147-161, 1955
5. Reitan,K.: Tissue behaivor 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.D.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. Koumas,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. 이 인환: 백서의 실험적 치아이동에 따른 치주조직의 조직학적 연구, 대치교지, 19:141-145, 1981.
11. 임 진환: 실험적 치아이동시 나타나는 백서 치주조직의 변화에 대한 조직학적 및 조직화학적 연구, 대치교지, 6:33-36, 1976.
12. Storey,E., Smith,R.: Force in orthodontics and its relatin 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.: Bone changes associated with tooth movement, Aust.J.Dent., 57:57-64,1953
15. Storey,E.: The nature of tooth movement, Am.J. Orthod., 63:292-314, 1973.
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. Burstone,C.J.: Application of bioengineering to clinical orthodontics. In Graber,T.M., Swain,B.F., eds., Orthodontics: current principles and techniques, The C.V. Mosby Co., 1985; 199-202.
18. Nakamura,M, Nakamura,T.K., Yoshikawa,M., Kubodera, T., Matsui,A., nakamura,R., Kiyomura,H.: Scanning electron microscopic study of vascular changes of periodontal ligaments following experimental tooth movement in rats, J.Jap.Orthod. Soc., 45:568-573, 1986.
19. Kindlova,M., Matena,V.: Blood circulation in the rodent teeth in the rat, Acta. Anat., 37:163-191, 1959.
20. Adams,D.: The blood supply to the enamel organ of the rodent incisors, Arch.Oral Biol., 7:279-286, 1962.
21. Sloan,P.: Scanning electron microscopy of the collagen fiber architecture of the rabbit incisor periodontium, Arch.Oral Biol., 23:567-572, 1978.
22. Melcher,A.H.: Remodeling of the periodontal ligament during eruption of the rat incisors, Arch.Oral biol. 12:1649-1651, 1967.
23. 현 성욱: 실험적 치아이동시 백서 상악전치 치근막의 혈관변화에 관한 연구, 서울대학교 치과대학 논문집, 12:311-331, 1988.
24. Davidovitch,Z., Montgomery,P.C., Eckerdal,D., Gustafson, G.T.: Cellular localization of cyclic AMP in periodontal tissues during experimental tooth movement in cats. Calcif.Tissue Res., 19:317-329, 1976.
25. Norton,L.A., Rodan,G.A., Bourret,L.A.: Epiphyseal cartilage cAMP changes produced by electrical and mechanical perturbations. Clin.Orthop., 124:59-68,1977.
26. Fitzgerald,P.J., Eidinoff,M.L., Knoll,J.E., Simmel,E.B.: Science, N.Y.,114:494,1951.
27. Owen,M.: Cell population kinetics of an osteogenic tissue. I, J.Cell Biol., 19:19-32, 1963.
28. Owen,M., McPherson,S.: Cell population kinetics of an osteogenic tissue. II, J.Cell Biol., 19:33-44, 1963.
29. Owen,M.: Celluar dynamics in bone. In: Bourne GH,ed.

The biochemistry and physiology of bone.: Academic Press, 1971: pp.271-298.
30. Kember,N.F.: Cell population kinetics of bone growth : the first ten years of autoradiographic studies with tritiated thymidine, Clin.Orthop., 76:213-30, 1971.
31. Roberts,W.E., Jee W.S.S.: Cell kinetics of orthodonttically stimulated and non-stimulated periodontal ligament in the rat, Arch.Oral Biol., 19;17-21, 1974.
32. Roberts,W.E., Chase,D.C., Jee W.S.S.: Counts of labelled mitoses in the orthodontically stimulated periodontal ligament in the rat, Arch.Oral Biol., 19;665-670, 1974.
33. Roberts,W.E., Goodwin,W.C., Heiner,S.R.: Celluar response to orthodontic force, Dent.Clin.North Am., 25;5-17, 1981.
34. Tayer,B.H., Gianelly,A.A., Ruben,M.P.: Visualization of cellular dynamics associated with orthodontic tooth movement, Am.J.Orthod., 54:515-520, 1968.
35. Baumrind,S., Buck,D.L.: Rate changes in cell replication and protein synthesis in the periodontal ligament incident to tooth movement, Am.J.Orthod., 57:109-131, 1970.
36. Kvam,E.: Cellular dynamics on the pressure side of the rat periodontium following experimental tooth movement, Scand.J.Dent.Res., 80:369-383, 1972.
37. Yee,J.A., Kimmel,D.B., Jee,W.S.S.: Periodontal ligament cell kinetics following orthodontic tooth movement, Cell Tissue Kinet., 9:293-302, 1976.
38. 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.
39. Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incoporated bromodeoxyuridine, Proc. Natl. Acad. Sci., 80;5573-5577, 1983.
40. Takashi S, Elichi S.: Prediction of malignant changes in oral precancerous lesion by DNA cytofluorometry, J.Oral Pathol., 12;90-102, 1983.
41. Gratzer HG, Leif RC, Ingram DJ, Castro A.: The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluocent determination of DNA replication of single cells and chromosomes, Exp.Cell Res., 95;88-94, 1975.
42. Gratzer HG, Pllack A, Ingram DJ, LEif RC.: Deoxyribonucleoic acid replication in single cell chromosomes by immunologic techniques, J.Histochem. Cytochem., 18;267-270, 1976.
43. Gratzer HG.: Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine. A new reagent for detection of DNA replication, Science, 218;474-475, 1982.
44. Miura F, Kurihara S.: Alveolar bone reaction caused by orthdontic stimulus, Dent Outlook, 61;1231-1242, 1983.
45. Aisenberg MS.: The tissue and change involved in orthodontic tooth movement, Am.J.Orthod., 34;854-859, 1948.
46. Ackerman JL, Cohen MI.: The effects of quantified pressures on bones, Am. J. Orthod., 52;34-46, 1966.
47. Macapanapan LÇ, Weinmann JP, Brodie AG.: Early tissue changes folllowing tooth movement in rats. Angle Orthod. 24;79-95, 1954
48. Baserga R.: The biology of cell production. Cambridge, havard University Press, 1985.
49. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H.: Production of a mouse antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation, Int.J.Cancer, 31;13-20, 1983.
50. Celis JE, Celis A.: Cell cycle dependant variatin in the distribution of the nucelar protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells; Subdivision of S-phase, Proc.Natl.Acad.Sci., 82; 3262-3266, 1985.

-ABSTRACT-

An Immunohistochemical Study on DNA Synthesis in the Periodontium during Tooth Movement in Dog

Seong-Jin Kim, D.D.S., M.S.D. **Na-Won Lim**, D.D.S., M.S.D. **Sang-Cheol Kim**, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dentistry, Graduate School, Wonkwang University.

The purpose of this study was to investigate the changes about the cellular activity on DNA synthesis in the periodontal ligament of dog, in which experimental tooth movement was performed.

A control and 5 experimental dogs, one and half year in age, were studied. Light force (50-75g) was applied by placing open-coil spring between left mandibular premolars; heavy force (250-300g), between right mandibular premolars. Experimental dogs were sacrificed after infusion of bromodeoxyuridine(BrdU), at 12 hours, 1, 3 ,7 and 14 days after force application, respectively. And the histologic and the immunohistochemical evaluation were performed on the obtained periodontal tissue around mandibular premolars, using anti-bromodeoxyuridine antibody, which can indicate proliferating cells.

The results were as follows:

1. The tearing of periodontal ligament and the vascular dilatation at tension side were observed in 12 hours, increasing until 3 days. After then it decreased; Such a finding was more evident in heavy force group than in light force group.
2. The hyalinization of the periodontal ligament and the activity of osteoclast at pressure side were observed in 12 hours, increasing until 3 days. But from 7 days on, it decreased; Such a finding was more evident in heavy force group than in light force group.
3. The BrdU expression in the control group was positive, mainly in the oral epithelium and the fibroblasts in the periodontal ligament, but negative in bone cells in periodontal ligament,.
4. The BrdU expression in the experimental group was more positive in tension side than in pressure side; The expression was a little more positive in the periapical area than in the cervical area of tooth.
5. The BrdU expression in light force group was the highest in 1 day, after which it decreased.; In heavy force group, it was the highest in 12 hours, after which it decreased. But in 14 days, there was no difference between the experimental group and control group.

KOREA. J. ORTHOD. 1996 ; 26 : 359-371

※ **Key words** : DNA synthesis, Periodontal ligament, Experimental tooth movement