

## 치근단질환에서 Nitric Oxide Synthetase 발현에 관한 연구

오수진 · 이수종 · 김은철\* · 임미경

원광대학교 치과대학 보존학교실, 구강병리학교실\*

### ABSTRACT

#### EXPRESSION OF NITRIC OXIDE SYNTHETASE IN PERIAPICAL LESIONS

Su-Jin Oh, Su-jong Lee, Eun-Chul Kim\*, Mi-Kyung Im.

*Department of Conservative Dentistry, Department of Oral Pathology\*,  
School of Dentistry, Wonkwang University*

The periapical response to injury is a complex interaction of inflammatory, immune, neural, vascular and synthetic activity. Nitric oxide(NO), synthesized by nitric oxide synthetase(NOS) from L-arginine, is becoming recognized as an important bio-regulatory molecule in a variety of tissue, but little is known about its possible role in periapical tissue.

The purpose of this study was to investigate the expression of nitric oxide synthetase(NOS) in tooth follicle, periapical abscess, granuloma and cyst. The expression of NOS in periapical lesions was evaluated by immunohistochemical staining for NOS<sub>2</sub>, and NOS<sub>3</sub>. The immunoreactivity was evaluated by staining intensity, and inflammatory cell infiltration. Correlationship between the periapical lesion in immunoreactivity were statistically analyzed by SPSS.

The degree of NOS<sub>2</sub> and NOS<sub>3</sub> expression in periapical abscess was higher than in any other periapical lesions, and statically significant. The expression degree of NOS<sub>2</sub> and NOS<sub>3</sub> was not correlated with periapical abscess and granuloma, but expression of NOS<sub>2</sub> showed very significant in periapical cyst. The increased expression of NOS<sub>2</sub> and NOS<sub>3</sub> was correlated with inflammatory cell infiltration degree of the periapical cyst.

These results suggested that NO should play an important role in progress and/or mediation of periapical lesions.

**Key Words :** Periapical lesion, NOS, Immunohistochemistry

### I. 서 론

치근단 병소인 치근단 농양, 육아종, 낭종 등은 감염으로 인한 지속적인 항원 자극결과로 발생하며 세균작용과 조직의 염증으로 치주인대, 상아질, 백악질, 그리고 골조직을 포함한 치주조직의 파괴를 가져온다. 이 과정 중에 탐식세포는 외부로부터 침입하는 이물질을 내부로 흡입하여 탐식한 후 분해하여 제거함으로써 면역 반응에 중요한 기능을 수행한다. 이물질을 탐식할 때 산소 및 질소를 이용하는 대사가 촉진되어 산소의 소모가 급격히 증가하게 되고 이 과정에서

발생하는 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)나 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical(OH), singlet oxygen(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)과 같은 여러 가지 반응 산소 중간 대사물(reactive oxygen intermediates; ROI)이나 nitric oxide(NO)같은 반응 질소 중간 대사물이 탐식세포내의 살균 작용 및 세포 독성 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 최근 보고 되고 있다<sup>1-3)</sup>.

반응 질소 중간대사물중의 하나인 Nitric oxide(NO)는 작고 불안정하며 전하가 없는 free radical로서 신체 여러 종류의 세포에서 분비되어 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환계에서는 혈관이완물질로<sup>4)</sup>, 중추신경계에서는 신경

전달물질로<sup>5)</sup>, 면역계에서는 방어물질<sup>6,9)</sup>로 작용한다.

치근단 낭종이나 육아종이 계속 팽창하면서 커지기 위해서는 주변의 골흡수가 동반되어야 하는데 이 과정에는 prostaglandin이나 다른 인자 등이 작용해 파골세포의 작용을 활성화하여 골의 흡수를 유도한다<sup>10)</sup>. NO가 최근 이런 골개조에 관여한다는 연구가 있어 왔는데<sup>11,12)</sup>, 파골세포 활성을 강력하게 억제할 수 있다고 1991년 Hakkanen등과<sup>13)</sup>, 1993년 Kasten이<sup>14)</sup> 보고하여 골대사와의 상관성이 입증되었다. 특히 Damoulis와 Hauschka<sup>15)</sup>는 NO가 단독으로 autocrine기능을 하거나 골모세포를 통해 paracrine기능으로서 파골세포를 유도시킬 수 있다고 보고하여 다기능 신호전달인자 및 국소적 조절자로서 역할을 한다고 하였다<sup>16-18)</sup>.

nitric oxide synthetase(이하 NOS)는 L-arginine으로부터 NO의 합성에 관여하는 효소로서 크게 두 종류로 대별되는데<sup>19)</sup>, 한 종류는 칼슘과 calmodulin에 의존적이며 혈관 내피세포 혹은 신경세포 등에 발견되는 것으로 NOS<sub>1</sub>과 NOS<sub>3</sub>이 여기에 해당된다. 또 다른 한 종류의 NOS는 칼슘이나 calmodulin 등에 비의존적이며, 염증반응으로 발현이 유도될 수 있는 효소로서 NOS<sub>2</sub>가 속한다. 즉 신체의 대식세포 혹은 호중구들이 적절한 cytokine으로 자극되면 자극된 세포들은 NOS<sub>2</sub>를 많이 발현시켜 많은 양의 NO를 생산하게 된다<sup>20)</sup>.

치근단 병소에서의 질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease), 치주질환에서와 같이 임파구, 대식세포, 중성구, 형질구의 침윤과 관련된 국소적인 염증반응을 갖고 있는 공통적 특징이 있다<sup>21)</sup>. 또한 골대사는 골흡수와 형성효과가 있는 호르몬과 cytokine에 의해 밀접하게 조절되어 정상적인 과정에서는 골형성이 흡수와 결합(coupling)되어 있으나, 폐경기 골다공증, Paget 질환 및 치주질환을 비롯한 대사성 및 염증성 골질환에서는 이런 균형이 깨져 골상실을 가져온다. interleukin-1이나 TNF- $\alpha$ 같은 염증성 cytokine은 골흡수에 강력한 국소적 자극 신호로서 작용하여<sup>22,23)</sup>, 치수 및 치근단질환에서 염증과정과 골 및 결합조직의 파괴에 중요한 역할을 한다. 치수 및 치근단질환에서 생성되는 NO 역시 염증과정과 골흡수에 중요한 역할을 할 것으로 사료되지만 치근단 질환을 중심으로 이들의 역할에 대한 연구는 미미하고, 특히 면역조직화학적 및 단백질 수준에서의 연구는 거의 이루어진 바 없었다.

본 연구에서는 치근단 질환에서 NOS의 분포 및 정도를 비교관찰하여 다른 염증성 골질환에서 처럼 NOS가 영향을 미치는지 여부와 NOS 발현정도와 치근단 질환의 상관성을 알아보고, 질환의 진행정도를 파악하고자, 면역조직화학적 연구를 통해 조직 내에서 발현부위 및 정도, 염증세포 침윤 정도와의 관련성 유무를 통계학적으로 비교하여 다소의 지

견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 연구방법

### 1. 연구대상

1997년 1월부터 98년 8월까지 원광대학교 치과대학 부속병원 보존과 및 구강외과에서 실시한 치근단 병소의 생검 조직중 임상기록부의 검색과 조직학적 관찰이 가능한 치근단 병소중 치근단 낭종 19례, 치근단 육아종 12례, 치근단 농양 11례와 정상 치배조직 9례를 포함하여 총 51례를 대상으로 하였다. 전체 환자의 평균연령은 41.6±21.5세 이었으며 여자가 59.8%였다.

### 2. 연구방법

#### 가. 조직학적 검색

치근단 병소로 생검된 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 알코올에 단계적으로 탈수한 후 파라핀 포매하여 4-5  $\mu$ m 두께로 연속 절편을 만들고 통상의 hematoxylin and eosin 염색을 하여 광학현미경으로 저배율 현미경 시야에서 섬유화 및 급, 만성 염증세포, 육아조직의 존재유무를 관찰하여 조직학적 치근단 질환을 확인하기 위해 검경하였다. 치근단낭종에서 염증의 분류는 염증세포의 침윤에 따라 O, I, II, III, (negative, mild, moderate, severe)의 4등급(Table 1)으로 분류하였다.

#### 나. 면역조직화학 염색

일차항체중 NOS<sub>2</sub>(Santa Cruz, polyclonal, USA)와 NOS<sub>3</sub>(Santa Cruz, Polyclonal, USA)는 각각 1/50로 희석하여 사용하였고 면역조직화학검사를 위하여 LSAB (labelled streptavidine biotin, Dako Co, Denmark) kit를 이용하였다. 이차항체로는 anti-mouse IgG를 사용하였고, 발색을 위하여 AEC (Aminoethyl Carbazole, Zymed Co, USA)를 이용하였다. 조직편을 박절하여

Table 1. Grading criteria of the inflammatory infiltration

Grade	Degree of inflammatory cell infiltration
O(negative)	free of inflammatory cell infiltration
I(mild)	focal small round cell infiltration
II(moderate)	diffuse small round cell infiltration with a few neutrophils
III(severe)	diffuse lymphoplasm cell and neutrophil infiltration with inflammatory exudate

ProbeOn Plus슬라이드(Fisher Scientific, USA)에 부착시킨 후 충분히 건조시켜 사용하였는데 염색은 ProbeOn Plus 슬라이드를 맞대어서 생기는 모세관 현상의 원리를 이용한 Microprobe System(Fisher Scientific, USA)을 이용하여 실시하였다. 4 - 5 $\mu$ m의 파라핀 절편을 탈파라핀화 및 수화시킨 후 일차항체를 적정 비율로 희석해 30분간 방치하고 이차항체를 10분간 부란시켰다. 그리고 streptavidine alkaline phosphatase로 10분간 처리하고 발색시킨 후, Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하고 검경하였다.

#### 다. 면역조직화학적 검색

먼저 면역조직화학적 발현부위를 각각의 병소의 세부조직 즉 모세혈관이나 섬유모세포 등으로 나누어 이런 발현차이가 각 질환의 부위에 따라서 관련이 있는지를 평가하였다. 각 질환간에 차이를 보기위해 염색된 조직표본에서 각각의 항체에 대한 양성반응을 상대적인 발현정도에 따라 세포들의 60%이상, 30 - 60%, 5 - 30%, 그리고 5%미만이 양성으로 염색되었을 때 각각 심도(+++), 중등도(++), 경도(+), 경미( $\pm$ ), 음성(-)으로 구분하였다. 양성판정 대상은 X 100시야에서 각 염색이 시행된 슬라이드중 염증세포가 가장 밀집되어 있고 병소의 가장 특징적인 부위 즉 낭종은 이장상피와 직하방 결체조직, 육아종은 육아조직, 농양은 농양 중심부위에서 각각의 일차항체에 양성으로 염색 정도를 측정하였고 3회의 무작위 반복검경을 시행하여 최빈값을 택하였다.

#### 라. 통계학적 분석

통계처리에 사용된 프로그램은 SPSS 7.5이고 분석기법으로는 Kruskal-Wallis ANOVA와 Spearman's Correlation analysis를 ascending order로 시행하였다.

### III. 결 과

#### 1. 치근단 질환에서 NOS<sub>2</sub> 및 NOS<sub>3</sub> 발현부위

정상치배는 미분화간엽세포로 이루어진 성긴 짐액섬유 결체조직으로 구성되어 있었는데 NOS<sub>2</sub> 발현은 치성상피잔사에서 중등도의 발현을 보였고 미분화 간엽세포와 모세혈관에서는 경도의 발현을 보였으며(Fig. 1A, 1C), NOS<sub>3</sub>는 NOS<sub>2</sub>발현세포와 동일세포에서 발현되었으나 미분화간엽세포와 모세혈관의 내피세포에서는 큰 차이가 없었지만 상피잔사에서는 NOS<sub>3</sub>가 약간 더 발현이 많았다(Fig. 1B, 1D).

치근단 농양의 농양강은 중성다형핵 백혈구로 구성되어 혈관은 충혈되어 있었고, 화농성 삼출물과 괴사잔사(Necrotic debris)에서는 NOS<sub>3</sub>가 거의 발현이 되지 않았

으나 NOS<sub>2</sub>는 삼출물내의 급성염증세포에서 상당한 발현을 보였고, 급성 염증세포 및 모세혈관에서는 NOS<sub>2</sub>가 심도의 발현을 보였으며(Fig. 2A) NOS<sub>3</sub>의 경우에도 NOS<sub>2</sub>와는 유사한 발현을 보여 치근단 농양에서는 전반적으로 발현유형 차이가 없었다.

치근단 육아종은 혈관조직이 섬유조직으로 대체되는 육아조직으로 증식되고 포말세포나 장방형의 콜레스테롤 열결 및 주위에 다핵거대세포로 이루어져 있었는데 NOS<sub>2</sub> 발현의 경우 육아조직내 염증세포 및 모세혈관에서 중등도의 발현을 보여(Fig. 3A) 치근단 농양보다는 감소된 양상을 나타냈으며, 섬유결체 조직벽내의 섬유모세포와 모세혈관에서 경미한 발현을 보였다. 콜레스테롤 열결에서는 NOS<sub>2</sub>가 거의 발현이 되지 않은 반면 주위 육아조직내의 염증세포나 다핵거대세포에서는 중등도의 발현을 보였다. NOS<sub>3</sub> 발현의 경우 육아조직내 염증세포 및 모세혈관에서는 경도로 나타나 NOS<sub>2</sub>보다는 감소된 양상이 관찰되었으며(Fig. 3B), 콜레스테롤 열결이나 다핵거대세포에서도 경미한 발현을 보여 NOS<sub>2</sub>와 많은 차이를 볼 수 있었다. 섬유결체조직벽에서는 NOS<sub>3</sub>는 거의 발현되지 않아 경도의 발현을 보인 NOS<sub>2</sub>와 차이가 있었다.

치근단 낭종에서는 낭종벽이 상피로 이장되고 염증세포 및 내강, 섬유결체 조직벽으로 이루어졌는데 NOS<sub>2</sub> 발현의 경우 주로 이장 상피, 상피하방 염증세포 및 모세혈관을 중심으로 중등도의 발현을 보였고 이장상피에서도 중등도의 발현을 보여 치배내의 치성상피잔사와 유사한 발현을 보였다(Fig. 4A). 상피층 중에서는 기저층이나 유극층의 상피층간에 발현구분이 없이 전 상피층을 중심으로 균일한 분포를 이루었다(Fig 4B). 염증세포 및 모세혈관에서 NOS<sub>2</sub>의 발현은 다른 치근단 병소와 큰 차이 없이 중등도 정도의 발현을 보였으며 섬유결체조직 벽에서는 거의 발현되지 않았다. NOS<sub>3</sub> 발현의 경우 이장상피에서 NOS<sub>2</sub>발현보다 적은 경도로 보였고, 염증세포나 모세혈관에서도 NOS<sub>2</sub> 발현보다 적게 나타났으며 섬유결체조직벽에서도 거의 발현되지 않았다(Fig. 4B, 4D).

#### 2. 각 치근단 질환에서 NOS<sub>2</sub>와 NOS<sub>3</sub>의 면역조직화학적 발현 정도 차이

NOS<sub>2</sub>는 치근단 농양에서 가장 많은 발현 정도를 보였으며 치근단 낭종 및 육아종에서는 거의 유사한 정도를 보였으며 병소간 차이는 통계학적으로 유의하였다( $p < 0.01$ ). 따라서 염증의 정도가 급성인 경우에 NOS<sub>2</sub> 발현이 많이 나타났고, 육아조직형성이나 섬유조직증식이 있는 육아종 단계나 낭종단계에서는 급성 염증단계보다 낮은 정도의 발현을 보임을 알 수 있었다. 또한 상피잔사가 포함된 치배 발육단계에서도 NOS<sub>2</sub>발현이 나타나고 있었으나 상피잔사 기원의

Table 2. Expression pattern of NOS<sub>2</sub> and NOS<sub>3</sub> in periapical lesions

Periapical lesions	structural components	NOS <sub>2</sub>	NOS <sub>3</sub>
Periapical cyst	lining epithelium	++	+
	inflammatory cells	++	++
	capillary	+	+
	fibrous wall	±	±
Periapical granuloma	inflammatory cells	++	+
	capillary	++	+
	fibrous wall	+	±
	cholesterol cleft	±	±
	foreign body type giant cells	++	+
Periapical abscess	necrotic debris	++	+
	inflammatory cells	+++	+++
	capillary	++	+++
Tooth follicle	Epithelial rest	++	++/+++
	mesenchymal cells	+	+
	capillary	+	+

Table 3. Expression degree of NOS<sub>2</sub> or NOS<sub>3</sub> in periapical lesions(ascending order)

Periapical Lesion(n)	Mean Rank	
	NOS <sub>2</sub>	NOS <sub>3</sub>
Cyst(19)	27.7	19.7
Granuloma(12)	23.7	19.8
Abscess(11)	37.1	40.9
Follicle(9)	11.7	29.0
p	0.001	0.000

근단 낭종에서도 NOS<sub>2</sub>가 크게 증가함을 볼 수 있어 치근단 질환의 발생에 기여한다고 볼 수 있었다.

NOS<sub>3</sub>의 경우에서도 치근단 농양에서 가장 많은 발현도를 보였으며 육아종 및 낭종은 거의 유사하였으며, 이런 발현 정도는 통계학적으로 유의하였다(p<0.05). 그러나 NOS<sub>2</sub>와 달리 낭종의 경우 대조군인 치배와 비교시 치배에서의 발현이 더 많이 나타나 근단 낭종의 발생기원과는 관련이 없었다.

### 3. 치근단 질환에서 NOS<sub>2</sub>와 NOS<sub>3</sub>간의 상관관계

치근단 육아종 및 농양의 경우 NOS<sub>2</sub>와 NOS<sub>3</sub> 발현 정도는 모두 상관관계가 없었다. NOS<sub>2</sub>에서는 치근단 낭종과 대조군인 치배의 경우 강한 양의 상관관계를 나타내어 치배보다 치근단낭종의 발현정도가 높은 관계를 보였다(p<0.05). NOS<sub>3</sub>의 경우에는 치근단 질환과 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

Table 4. Correlation between NOS<sub>2</sub> and NOS<sub>3</sub> expression degree in periapical lesions

NOS <sub>2</sub>	NOS <sub>3</sub>			
	Cyst	Granuloma	Abscess	Follicle
	0.609*	0.219	0.214	0.919*

\*: statistically significant at p<0.05

Table 5. Correlation between inflammatory cell infiltration and NOS<sub>2</sub> or NOS<sub>3</sub> in cyst

	NOS <sub>2</sub>	NOS <sub>3</sub>
Inflammatory degree	0.841	0.554
p	0.000	0.014

### 4. 치근단 낭종의 염증정도와 NOS<sub>2</sub>및 NOS<sub>3</sub>발현의 상관관계

치근단 낭종의 염증 정도와 NOS<sub>2</sub>와 NOS<sub>3</sub> 발현정도 상관관계는 양의 상관관계를 보여 치근단 낭종의 염증침윤 정도가 심할수록 NOS발현정도는 증가됨을 보여주었다.

## IV. 총괄 및 고찰

치근단 농양, 육아종, 낭종 등의 치근단 병소는 치수의 세균침입으로 치수 감염과 괴사가 일어나고 국소적인 염증반응을 일으켜 치근관으로부터 치근단 부위에 손상을 주어 발생된다. 치수조직의 세균 감염은 치수괴사를 유발하며 근관

계에 많은 양의 염증산물의 축적을 유발하며, 치수 자극 물질이 치근단 조직으로 침투하면 치근단 주위에 염증과 골흡수를 일으킨다<sup>24,26)</sup>.

탐식세포는 세균을 탐식하거나 여러 cytokine의 자극을 받으면 반응산소 중간대사물이나 반응 질소중간 대사물을 생산한다<sup>27,28)</sup>. 탐식세포를 활성화시킬 수 있는 T세포가 생산하는 림포카인의 영향을 탐식세포가 받으면 탐식세포는 superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 반응산소중간물질(reactive oxygen intermediate: ROI) 이나 NO와 같은 반응질소중간물질(reactive nitrogen intermediate: RNI)을 생성할 수 있게 됨으로써, 탐식된 세포내 산물을 효과적으로 사멸시키던가 아니면 증식을 저지할 수 있게 된다<sup>29,30)</sup>.

Prostaglandin, 교원질 분해효소 등의 골흡수인자는 파골세포 및 단핵구로 하여금 골을 흡수하게 촉진함으로써 치근단 병소가 계속 성장할 수 있게 한다<sup>31)</sup>. 따라서 본 연구에서는 치근단 질환도 염증성 골질환으로 골상실이 일어나는 질환이기 때문에 치근단 조직의 파괴 또는 병소발생에 NO가 관련이 있으리라 사료되어 치근단 질환인 치근단 낭종, 육아종, 농양환자와 대조군으로 치배를 대상으로 NO의 역할을 알아보고자 하였다.

최근에 이르러 골개조에서 NO의 역할이 다양한 세포, 조직배양, 동물실험에서 보고되기 시작하였는데 NO가 생체내와 실험상 모두 파골세포의 매개에 의한 골 재흡수가 억제되며, 염증매개체(inflammatory mediator)가 많아짐에 따라 골아세포가 autocrine기능을 감소시킴에 따라 NO생산을 하게 한다고 보고된 바 있다<sup>32,33)</sup>.

NO는 L-arginine이 nitric oxide synthetase(NOS) 다축매 동위효소들의 반응을 통해서 합성될 뿐 아니라, NO와 L-citrulline으로 화학변화 시키는데 필요한 다양한 보조인자들의 산화반응에 의해서도 합성된다. NOS 유형은 Calcium 및 calmodulin 의존형인 NOS<sub>1</sub>과 NOS<sub>3</sub>로 나누어지는데 NOS<sub>1</sub>은 신경원에서 처음 발견되어 12q24.2에 유전자가 위치하고 주로 신경을 중심으로 발현되기 때문에 본 연구에서는 대상으로 하지 않았다.

NOS<sub>3</sub>는 혈관 내피세포에서 처음 발견되며 7q35-36에 위치하는데<sup>34,35)</sup>, NOS<sub>3</sub>는 칼슘에 의존적인 효소로써, 자극에 의하여 소량의 NO를 짧은 시간 분비하게 되며 이때 분비된 NO는 근육을 이완시켜 혈관을 확장시키는 역할을 한다. 이러한 NO의 생리적 작용은 NO가 목적세포의 cyclic GMP의 양을 증가시키기 때문인 바 cGMP의 양을 NO가 guanyl cyclase의 heme group에 부착하여 guanylyl cyclase를 활성화시키기 때문임이 밝혀졌다<sup>7)</sup>.

본 연구에서는 NOS<sub>3</sub>에 관해 면역조직화학적으로 치근단 질환에서 연구된 바가 없어 비교할 수는 없었으나 NOS<sub>3</sub>의 발현은 전반적으로 혈관을 중심으로 나타났고 치근단 농양

의 급성 염증세포 및 모세혈관에서는 NOS<sub>3</sub>가 심도의 발현을 보였으며, 치배의 모세혈관에서는 경미의 발현을 보였으나 염증이 집중된 혈관분포가 풍부한 곳에 NOS<sub>3</sub>가 많이 출현하여, 치근단부내의 NOS<sub>3</sub>와 혈관사이 밀접한 관계가 있음을 보였다. 각 치근단 질환간에는 NOS발현 차이가 있었는데, 치근단 농양에서 NOS<sub>3</sub>가 가장 많은 발현을 보였으며 통계적으로 유의하였는데(P<0.01), 이는 치근단 농양에서 가장 많은 혈관성을 보이기 때문으로 여겨졌다.

치근단 육아종에서 육아조직내 모세혈관을 중심으로 염증세포와 함께 NOS<sub>3</sub> 발현이 중등도로 나타나지만 섬유결체조직내의 섬유모세포와 모세혈관에서 경미한 발현을 보여 섬유결체조직형성과 NOS<sub>3</sub> 발현은 큰 관련이 없었음을 알 수 있었다. 따라서 치근단 육아종은 치수의 괴사와 근단공과 측방공을 통한 근관에서 치근단 주위 조직으로의 세균과 세균독소의 확산결과 생기는 치주내와 연속되는 육아조직의 성장이기 때문에 NOS<sub>3</sub> 발현이 최종적인 세포의 기질의 침착과 반응의 종료단계에서 주로 관계되기 보다는 육아조직 성장기에 주로 관련된다고 사료되었다.

치근단 낭종에서 NOS<sub>3</sub> 발현의 경우 주로 이장상피 하방 염증세포 및 모세혈관을 중심으로 NOS<sub>2</sub>발현보다 적은 정도로 나타났고, 치근단 낭종의 염증 정도와 NOS<sub>3</sub> 발현상관관계는 양의 상관관계를 보여 염증침윤정도가 심할 수록 NOS발현정도는 증가되는 관계를 보였다. 치근단 낭종에서 상피 등의 세포 분열을 촉진하는 것은 염증에 의한 국소적인 환경의 변화라고 생각되는데<sup>36-38)</sup> 염증이 심할수록 NOS의 발현이 증가되는 것은 염증세포가 세포의 분열을 촉진시키는 신호를 보내고 이 신호로 혈관 생산이 증가되어 나타나는 상승조절 기전 때문이라고 생각된다.

또한 두종류의 NOS가 각각 다른 세포에 분포되어 있는 것이 아니라 동일세포에 NOS<sub>3</sub>, NOS<sub>2</sub>가 같이 존재함이 밝혀졌는데<sup>39)</sup>, 본 연구에서도 모세혈관 내피세포 및 염증세포에서 NOS<sub>3</sub>, NOS<sub>2</sub>가 모두 발현됨이 관찰되었고 따라서 혈관내피 세포같은 경우 NOS<sub>1</sub>과 NOS<sub>3</sub> 같은 효소를 가지고 있지만 NOS<sub>2</sub> 같은 유도성 효소를 가질 수 있으며, 마찬가지로 대식세포는 유도성 효소를 많이 발현시킬 수 있지만 calcium과 calmodulin에 의존적인 NOS 효소도 나타날 수 있다고 사료된다.

NOS<sub>2</sub>는 Ca<sup>2+</sup>에 비의존적이며 NOS의 유도형으로서 다양한 세포에서 발현되며 17cen-q12에 위치하고<sup>34,35)</sup> 여러 조직들에서 발현되지만, NOS 효소들은 다양한 기전에 의해 광범위하게 조절되고, 세포와 조직분포 등에 따라 기능적 역할이 다르다<sup>39-41)</sup>.

본 연구의 치배에서 NOS<sub>2</sub>는 치성상피장사, 미분화간엽세포와 모세혈관에서 발현이 되었는데, 아무런 자극을 주지 않은 정상조직에서 발현이 되는 점은 특이한 소견으로 여겨지나 최근의 보고에 따르면 내독소나 cytokine같은 면역학

적 자극을 주지 않은 상태(basal condition)에서도 발현된다고 한다. 즉 iNOS mRNA가 정상 비장, 신장세포에서 발현된다고<sup>42,43)</sup> 하였고 면역조직화학적으로도 난관의 평활근 세포와 신장에서 관찰됨이 보고<sup>44,45)</sup>되었기 때문에 본 연구의 치배에서 결과가 정상상태에서도 NOS<sub>2</sub> 발현이 나타나는 한 증거라고 여겨진다.

본 연구에서는 치근단 질환의 염증부위에서 NOS<sub>2</sub>의 발현이 많은 것을 보였다. 이러한 소견은 국소적인 염증반응시 치근부의 치주인대와 치수의 염증세포와 상호작용을 하는 것으로 사료되었다. 또한 치근단 농양 및 육아종과 낭종에서 염증세포 및 모세혈관에서는 NOS<sub>2</sub>가 중등도 이상의 발현을 보였으며 치근단 질환중에서는 치근단 농양에서 NOS<sub>2</sub> 및 NOS<sub>3</sub>가 가장 많은 발현을 보였으며 통계적으로 유의하였는데(p<0.05), 이런 소견은 농양에서 염증세포 침윤이 가장 현저히 나타나기 때문에 NOS<sub>2</sub>가 유도성 NOS로써 염증신호에 민감하게 반응한 결과로 사료되었다.

건전 치배 보다 치근단 낭종에서의 NOS<sub>2</sub>발현이 상대적으로 많은 발현을 보였는데 이러 소견은 치근단 질환의 발생에 기여한다고 생각된다. 또한 치근단 낭종의 염증 정도와 NOS<sub>2</sub>와 발현 상관관계는 양의 상관관계(p<0.05)를 보여 염증침윤정도가 심할 수록 NOS발현정도는 증가되는 관계를 보였다. 이런 결과는 Summers<sup>37)</sup>의 상피잔사가 분열하여 치근단낭을 형성한다고 하는 보고나 낭종의 병인은 자극에 의하여 비후한 상피의 중심부에서 허혈성 괴사가 일어나 내강이 형성되면서 발생한다고 하는 보고에서<sup>36,37,46)</sup>와 유사하였다. 그러나 본 연구대상이 치근단 병소의 발생과정 전 기간 동안의 지속적인 변화에 관한 것은 아니라, 주로 발생과정 중의 한 순간 또는 발생 후의 상태에 관한 것이기 때문에 치근단 병소의 발생중의 전반적인 변화에 관한 연구들이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

치근단 조직의 파괴도 골흡수의 유발과 골형성의 억제에 의해 유발되는데, 특히 최근 파골세포들에 대한 NOS<sub>2</sub> 연구가 많이 이루어지고 골아세포들에 의해서도 NO가 생산된다고 밝혀졌지만, 직접적으로 염증물질을 유도하고 합성하는지 또는 파골세포에서 NO가 유리되는지는 명확히 알려지지 않았다<sup>14,47)</sup>. 따라서 파골세포들이 NOS<sub>2</sub>의 조절자로서 확실히 밝혀지지 않았기 때문에 골을 재흡수하는 파골세포에서 유전자의 조절을 설명하기 위한 새로운 기전이 연구되어야 하며, 염증 자극에 대한 NO를 유리하는 세포의 정확한 기능은 아마도 osteopontin을 포함한 골기질의 효과와 관련이 있다고 생각되어지고 이에 대한 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

본 연구의 치근단 질환에서도 모세혈관을 중심으로 NOS<sub>3</sub> 및 NOS<sub>2</sub> 발현이 크게 나타나고 염증성 치근단 질환시 나타나는 국소적인 골의 파괴는 만성 또는 급성염증과 관련이 있는데, 이러한 염증시 조직에서 cytokine이나 신경전달물

질이 방출되어 치근단 부위의 세포 즉, 치주인대세포와 치주인대기질, 하방 골세포 등에 직접 작용하거나 혈관계를 통해 작용하는 것으로 보고되었기 때문에<sup>48)</sup> 본 연구의 결과에서 면역조직화학적으로 NOS가 치근단 질환과 같은 염증성 골질환과 밀접한 관련이 있음을 보여주어 치근단 질환에 의해 유도되는 cytokine에 NO가 조절역할을 하는 것으로 여겨져 치근단 질환에 의해 야기되는 골조직의 파괴에 대해 치유를 촉진시키는데 이용가능할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

Nitric Oxide는 L-arginine으로부터 Nitric Oxide Synthetase에 의해 합성되며, 최근 국소적인 골개조 형성에 관여하여 다기능 신호전달인자 및 국소적 조절자로서 관심의 대상이 되고 있고, 치근단 병소의 파괴는 주위의 골흡수를 일으키고 골형성의 억제에 의해서 유발되기 때문에 치근단 질환에서의 NO가 다른 염증성 골질환에서 처럼 중요한 역할을 할 것으로 사료되지만 이들의 역할에 대한 연구는 거의 이루어진 바 없었다.

이에 본 연구는 치근단 질환에서 NOS 발현부위와 정도를 알아보고 치근단 질환과의 상관성을 밝히며, 염증세포 침윤 정도와의 관련성 유무를 보기 위해 NOS<sub>2</sub>, NOS<sub>3</sub>에 대한 면역조직화학염색을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치배에서 NOS<sub>2</sub>와 NOS<sub>3</sub>는 치성상피잔사, 미분화간엽세포와 모세혈관에서 공동발현 되었으나 발현차이는 크게 없었다.
2. 치근단 농양의 급성 염증세포 및 모세혈관에서는 NOS<sub>2</sub>가 심도의 발현을 보였으며 NOS<sub>3</sub>는 NOS<sub>2</sub>와 유사한 발현을 보였다.
3. 치근단 육아종에서 NOS<sub>2</sub>는 육아조직내 염증세포 및 모세혈관에서 중등도의 발현을 보였고 NOS<sub>3</sub>는 NOS<sub>2</sub>보다 적게 관찰되었다.
4. 치근단 낭종에서 NOS<sub>2</sub>는 주로 이장상피, 상피하방 염증세포 및 모세혈관을 중심으로 중등도의 발현이 나타나 치근단 육아종과 유사하였으며, NOS<sub>3</sub> 발현의 경우 동일 부위에서 NOS<sub>2</sub>보다 적은 정도로 나타났다.
5. 치근단 질환중 치근단 농양에서 NOS<sub>2</sub> 및 NOS<sub>3</sub>가 가장 많은 발현을 보였으며 병소별 차이는 통계적으로 유의하였다.
6. 치근단 육아종 및 농양에서는 NOS<sub>2</sub>와 NOS<sub>3</sub> 발현정도 간에 상관관계가 없었으나 NOS<sub>2</sub> 발현정도와 치근단 낭종과 치배에서는 높은 상관관계를 보였다.
7. 치근단 낭종의 염증정도와 NOS<sub>2</sub> 및 NOS<sub>3</sub> 발현간의 상관관계는 양의 상관관계를 보여 염증 침윤정도가 심할 수록 NOS발현 정도는 증가되는 관계를 보였다. 이상의 결과로부터 NOS가 치근단 질환과 같은 염증성 골

질환과 밀접한 관련이 있고 치근단 질환의 진행에 기여한다고 사료되었다.

### 참고 문헌

- Allison AC. Macrophage activation and nonspecific immunity. *Int Rev Exp Pathol* 18 : 304-309, 1978.
- Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Eng J Med* 9 : 659-668, 1978.
- Klebanoff SJ. Phagocytic cells: Production of oxygen metabolism in "Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates" Ed Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R New York: Raven Press : 391-444, 1988.
- Palmer RM, Ferrige JAG, Moncada S Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxant factor. *Nature* 327 : 524-526, 1987.
- Fishnan PS, Savitt JM. Selective localization by neuralgia of immunoglobulin G in normal mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 48 : 212-218, 1989.
- Higuchi MM, Higashi N, Taki, and Osawa T Cytolytic mechanisms of activated macrophages Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144 : 1425-1431, 1990.
- Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of Nitric Oxide. *Scientific American* May : 28-48, 1992.
- Suther DJ, Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection lymphokines or interferon- $\gamma$ . *J Immunol* 139 : 518-527, 1987.
- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235 : 473-476, 1987.
- Browne RM. The pathogenesis of odontogenic cysts : a review. *J Oral Pathol* 4 : 31-46, 1975.
- Zaidi M, Alam AS, Bax BE, Shankar VS, Bax CM, Gill JS, Pazianas M, Huang CL, Sahinoglu T, Moonga BS, Stevens CR, Blake DR. Role of the endothelial cells in osteoclast control: New perspectives. *Bone* 14 : 97-102, 1993.
- Collin-Osdoby P, Nickols A, Osdoby P Bone cell function, regulation, and communication: A role for nitric oxide. *J Cell Biochem* 57 : 399-408, 1995a.
- Hukkanen M, Hughes FJ, BATTERY LDK, Gross SS, Evans TJ, Seddon S, Riveros-Moreno V, MacIntyre I, Polak J. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat, and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinol* 136 : 5445-5453, 1995.
- Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Siegel NR, Misko TP, Currie MG, Nickols GA. Potentiation of chicken osteoclast bone resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *J Bone Miner Res* 8(suppl. 1) : 188.(abstract), 1993.
- Damoulis PD, Hauschka PV. Cytokines induces nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 201 : 924-931, 1994.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin C. Nitric oxide. A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157 : 87-97, 1988.
- Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169 : 1543-1548, 1989.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system. A transduction mechanism for stimulation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 5159-5162, 1989.
- Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric Oxide. A Novel Biologic messenger. *Cell* 70 : 705-717, 1992.
- Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol* 141 : 2407-2403, 1988.
- Stern MH, Drezen S, Mackler BF, Selpst AG, Levy BM. Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *J Endod* 7 : 117-122, 1981.
- Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russel RGG. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 306 : 378-380, 1983.
- Bertoloni DR, Nedwin G, Bringman D, Smith D, Mundy GR Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor. *Nature* 319 : 516-519, 1986.
- Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 $\alpha$  in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol* 8 : 50-56, 1993.
- Matsuo T, Ebisu S, Nakanishi T, Yonemura K, Harada Y, Okada H. Interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in periapical exudates of infected root canals: Correlation with the clinical findings of the involved teeth. *J Endodon* 20 : 432-435, 1994.
- Miller GA, DeMayo T, Hutter JW. Production of interleukin-1 by polymorphonuclear leukocytes resident in periodontal tissue. *J Endod* 22 : 346-351, 1996.
- Clark RA The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 161 : 1140-1146, 1990.
- Babior BM. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 9 : 569-668, 1978.
- Moncada S, Palmer RJJ, Higgs EA. Biosynthesis of the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38 : 1709-1715, 1989.
- Nathan CF, Stuehr DJ. Editorial. Dose endothelium derived nitric oxide have a role in cytokine-induced hypotension? *J Natl Canc Inst* 82 : 726-728, 1980.
- Harvey w, Guat-Chen F, Gordon D, Meghji S, Evans A, Harris M. Evidence for fibroblasts as the major source of prostacyclin and prostaglandin synthesis in dental cyst in man. *Archs Oral Biol* 29 : 223-229, 1984.
- MacIntyre I, Zaidi M, Alam ASMT, Datta HK, Moonga BS, Lidbury PS, Hecker M, Vane JR. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 2936-2940, 1991.
- Kasten T, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Krukowski M, Misko T, Settle S, Currie M, Nickols A. Potentiation of osteoclast bone resorptive activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 3569-3573, 1994.
- Marietta MA. Nitric oxide synthetase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78 : 927-930, 1994.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthetase: roles, tools and controls. *Cell* 78 : 915-918, 1994.
- Shear M. The histogenesis of the dental cyst. *Dent Prac* 13 : 238-243, 1963.
- Summers L. The incidence of epithelium in periapical granulomas and the mechanism of caritation in apical dental cysts in man. *Arch Oral Biol* 19 : 1177-1180, 1974.
- Pusztai L, Lewis CE, Lorenzen J, Mcgee JOD. Growth factors : regulation of normal and neoplastic growth. *J path* 169 : 191-201, 1993.

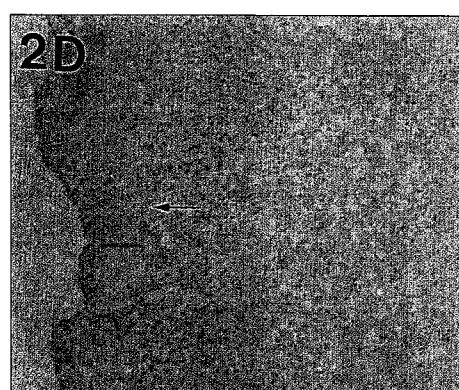
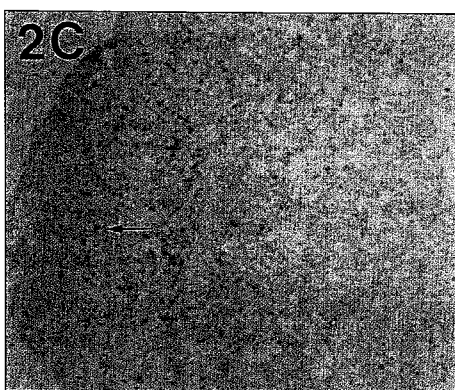
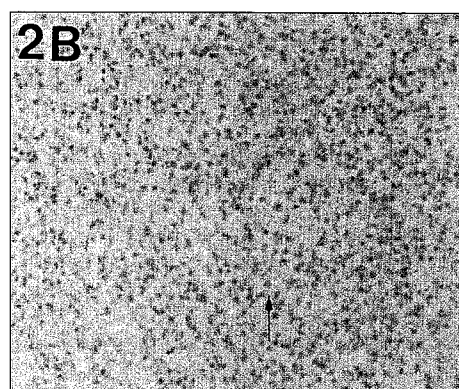
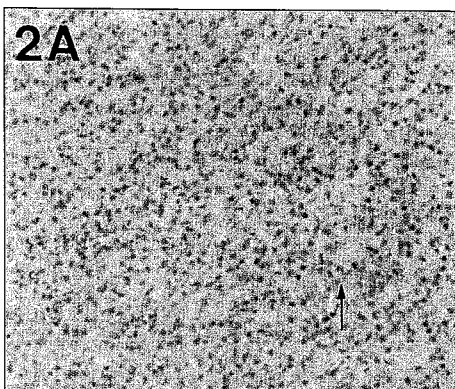
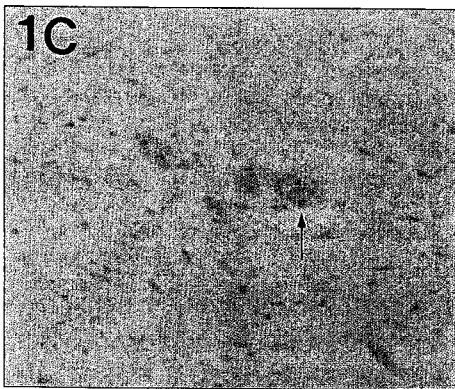
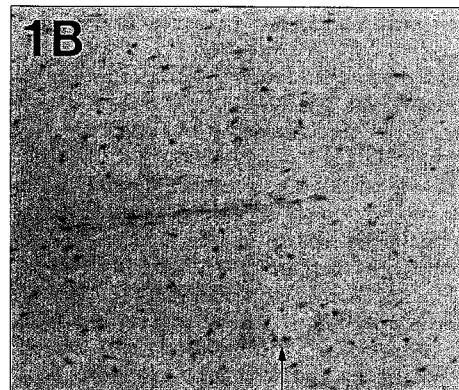
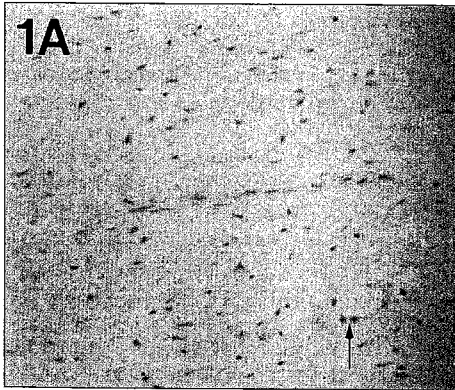
39. Moncada S, Palmer R, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Biol* 54 : 171-178, 1991.
40. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanisms. *Ann Rev Physiol* 57 : 707-736, 1995.
41. Rief DW, McCreedy SA. N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch Biochem Biophys* 320 : 170-176, 1995.
42. Liu S, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1208-1213, 1993.
43. Ahn KY, Mohaupt GM, Madsen KM, Kone BC. In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol* 267:F748-F757, 1994.
44. Bryant CE, Tomlinson A, Mitchell JA, Elliot J, Schmidt HW, Thiemermann C, Gross SS, Wolloughby DA, Vane JR. Inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in the rat ovary and fallopian tubes: a possible role in reproductive biology(Abstract). *Endothelium* I, Suppl, S74, 1993.
45. Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HHHW, Wilcox CS, Madsen KM. Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 4: 1438-1447, 1994.
46. Ten Cate AR. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cysts. *Oral Surg* 34: 956-964, 1972.
47. Sunyer T, Rothe L, Jiang XS, Osoboy P, Collin OP. Pro-inflammatory agents, IL-8 and IL-10 upregulate inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells. *J Cell Biochem* 60 : 469-483, 1996.
48. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am* 32 : 411-435, 1988.

### 사진부도 설명

- Fig. 1 Immunohistochemical staining of NOS<sub>2</sub>(A, C ×200) and NOS<sub>3</sub>(B, D ×200) of tooth follicle. NOS<sub>2</sub> & NOS<sub>3</sub> positive cells(arrow) is seen in the odontogenic epithelial rests and undifferentiated mesenchymal cells.
- Fig. 2. Immunohistochemical staining of NOS<sub>2</sub>(A, C ×100) and NOS<sub>3</sub>(B, D ×200) of periapical abscess. NOS<sub>3</sub> expression was rare in abscess cavity and necrotic debris, but NOS<sub>2</sub> was more expressed than NOS<sub>3</sub>.
- Fig. 3. Immunohistochemical staining of NOS<sub>2</sub>(A, ×100) and NOS<sub>3</sub>(B ×100) of periapical granuloma. NOS<sub>2</sub> expression in granulation tissue were similar to that of NOS<sub>3</sub>
- Fig. 4. Immunohistochemical staining of NOS<sub>2</sub>(A, C, D ×100) and NOS<sub>3</sub>(B, E ×100) of periapical cyst. Moderate inflammation (D, E), Mild inflammation(A, B) in connective tissue wall were noted.



사진부도 ①



사진부도 ②

