

흰쥐대구치 치수노출후 치수조직내 CGRP함유 신경섬유의 분포에 관한 면역조직화학적 연구

김은성 · 박일윤 · 문주훈
조선대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON THE DISTRIBUTION OF CGRP CONTAINING NERVE FIBERS AFTER PULP EXPOSURE IN RAT MOLAR

Eun-Soung Kim, D.D.S., Il-Yoon Park, D.D.S., M.S.D., Joo-Hoon Moon, D.D.S., M.S.D., Ph.D.
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Chosun University.

The purpose of this study was to investigate the distribution of calcitonin gene-related peptide(CGRP) containing nerve fibers after pulp exposure in rats.

The Spague-Dawley rats weighing about 250 - 300g were used. The animals were divided into normal control group and experimental groups. Experimental animals were sacrificed on 2, 4, 7, 10 days after pulp exposure. The maxillary teeth and alveolar bone were removed and immersed in the 4% paraformaldehyde plus 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). Serial frozen 50 μ m thick sections were cut with a cryostat.

In the immunohistochemical staining procedure, the rabbit CGRP antibody was used as a primary antibody. The sections were incubated for 48 hours at 4 $^{\circ}$ C, and placed into biotinylated anti-rabbit IgG as a secondary antibody and incubated in ABC(avidin-biotin complex). The sections were visualized by 0.05% 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride.

The results of this study were as follows :

1. In control group, CGRP containing nerve fibers ran parallel to the long axis of root and reached the coronal pulp. They were distributed on Raschkow plexus under the odontoblastic layer
2. In 2 day group after pulp exposure, tissue necrosis and acute inflammation occurred and CGRP containing nerve fibers increased. In 4 day group, the necrotic tissue extended to the pulp and CGRP containing nerve fibers were distributed around the inflammation zone
3. In 7 day group after pulp exposure, pulp necrosis occurred, and in 10 day group, the abscess under the necrotic pulp extended to the root apex area and CGRP containing nerve fibers were not observed in root canals
4. The sprouting of CGRP nerve fibers was most remarkable at the pulp chamber under injury in 4 day group, and it was found at inflammation zone under the necrotic tissue in 7 day group and the remaining root pulp tissue in 10 day group.

As mentioned above, CGRP nerve fibers had a tendency to increase around the inflammatory zone, especially around the acute inflammation tissue, when compared with control group. It is suggested that CGRP nerve fibers maybe related to the control of inflammatory response of pulp tissue.

Key Words : CGRP(calcitonin gene-related peptide) containing nerve fiber, Immunohistochemistry, nerve Sprouting

* 이 논문은 1997년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

I. 서 론

신경펩타이드는 신경계에 포함된 단백질로서 중추 및 말초신경계에서 면역조직화학적 방법에 의해 발견되었으며, 대부분 신경조절물질로 작용하나 이들 중 일부가 신경전달물질로 작용한다는 것이 밝혀졌다.

신경펩타이드에 관한 선행들의 연구에서, 치수의 감각신경 말단에는 substance P(SP)¹⁻³⁾, calcitonin gene-related peptide(CGRP)²⁻⁶⁾, neurokinin A(NKA)⁷⁻⁹⁾와 neuropeptide Y(NPY)^{10,11)} 등의 신경펩타이드가 존재하며, 이는 삼차신경절에 있는 세포체에서 합성되어 축삭을 따라 이동하여 신경말단에 저장된다고 보고되었다. 신경펩타이드를 함유하는 신경섬유는 치수중심부의 혈관주변과 치수 주변부의 조상아세포층 하부에서 발견되며, 상아전질 쪽으로 주행하여 상아전질과 상아세포관내로 침투해 들어감이 관찰되었다^{5,12,13)}.

1982년 Amara¹⁴⁾에 의해 밝혀진 CGRP는 37개의 아미노산으로 이루어진 신경전달물질로 calcitonin gene의 전사중에 calcitonin과 다른 단백을 만드는 mRNA에 의해 발현되는 것으로 알려져있으며¹⁵⁾, 삼차신경등의 1차 구심성 신경뿐 아니라 삼차신경핵등¹⁶⁻¹⁹⁾에서도 발견되며 치수^{2,4,20)}, 치주조직¹²⁾등의 말초신경섬유에서도 널리 분포한다고 보고되었다. CGRP는 통증을 전달하는 무수초 신경섬유(C섬유)와 작은 수초 신경섬유(A 섬유)에 존재함으로써 통각에 관여하는 신경전달물질인 SP와 같이 통각의 전도에 중요한 역할을 담당하며, CGRP등의 신경펩타이드가 미세순환에 미치는 영향에 관한 연구에서 혈관확장과 혈관투과성을 증가시킨다고 보고되었다^{2,21-23)}.

치수의 신경분포에 관한 연구에서, 치수에 분포하고 있는 신경은 대부분 삼차신경의 구심성 감각신경과 일부 상경신경절에서 나오는 교감신경 분지로 구성되어있으며¹³⁾, 특히 CGRP함유 신경섬유는 치수내에서 가장 많이 존재하고, 치근단공을 통하여 다발로 치수에 인입하여 전체 치수에 분포되며 조상아세포층 하방과 전상아질 및 상아질에도 분포하는 것으로 보고되어, 치아 손상시 CGRP함유 신경섬유의 분포변화를 관찰함으로써 손상에 대한 치수의 반응정도를 규명하고자 하였다^{4,5,20)}.

이와 같은 치아손상시의 치수반응에 관하여, Grutzner 등²⁰⁾은 치수조직에서 상대적으로 높은 농도를 나타내는 신경펩타이드인 CGRP와 SP의 치수 손상정도에 따라 양적인 평가를 하였으며, Taylor와 Byers²⁴⁾는 흰쥐 대구치에 5급 외동을 형성하여 치수반응을 유도한 뒤 발생한 미세농양의 치유와 수복상아질의 형성에 따른 CGRP함유 양성신경섬유의 분포변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰하여, 손상에 대한 치수의 반응에 감각신경섬유의 발아가 어떠한 역할을 하는지 규명하고자 하였다. 또한 Kimberly와 Byers¹²⁾

는 흰쥐 대구치 치수가 노출될 때까지 교합면을 삭제하여 형성된 치수염과 치근단병소에서 CGRP를 함유한 신경섬유의 반응을 보고하였으며, Khayat 등⁵⁾은 흰쥐 대구치 치수를 노출시킨 후 치수내 염증에 대한 CGRP함유 양성신경섬유의 반응과 동시에 치근단병소가 형성되는 동안 CGRP함유 양성신경섬유의 발아를 치근단부에서 관찰하여, 임상적으로 방사선 투과성 병소를 갖는 치아의 치료시 느끼는 동통에 대해 원인을 밝혀내고자 연구하여 보고한 바 있다. Byers와 Taylor는²⁵⁾ 하악에서 하치조신경의 절단 유무에 따라 흰 쥐의 대구치에서 치수를 구강환경에 노출시킨 후 치수의 생활력과 초기 치유반응에 대해 연구한 결과, 치수조직의 손실이 하치조신경공급을 받지 못한 치아에서 더 컸다는 것을 보고하여 감각신경과 신경펩타이드의 역할에 대한 분석을 하였다. 이외에도 삼차신경절에서의 CGRP 존재 여부에 대해 면역조직화학적 염색을 통한 많은 연구가 이루어져 Rosenfeld 등¹⁵⁾은 삼차신경절에 CGRP를 함유한 신경세포를 관찰하였고, Lee 등²⁶⁾은 삼차신경절에서 CGRP를 함유한 신경세포안에 SP가 같이 공존하기도하며, CGRP가 SP의 기능을 증진시키는 것으로 보고하였다.

국내에서 CGRP에 관한 연구로 이 등²⁷⁾은 흰 쥐에서 척수신경 뒤쪽뿌리(posterior root of spinal nerve)를 절단한 후 척수뒤뿌리(spinal dorsal horn)에서의 SP 및 CGRP함유 신경섬유에 대하여 면역조직화학적으로 연구하였으며, 박 등¹⁷⁾은 흰 쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서 CGRP 면역반응세포의 분포에 관하여 연구하였다. 김 등¹⁶⁾의 연구에서는 흰 쥐 안와하신경의 절단시 그 신경의 일차구심성신경원이 있는 삼차신경절에서의 CGRP함유 세포의 분포에 관해 면역조직화학적 방법으로 관찰하고자 하였지만 지금까지 치수에 손상을 가한후 CGRP함유 신경섬유에 대한 연구는 아직까지 미흡하여, 본 연구에서는 흰쥐 대구치의 교합면을 삭제하여 치수를 노출시킨 후 발생하는 치수조직내 염증반응에 대한 CGRP 양성 신경섬유분포의 변화양상을 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 치수손상에 대한 CGRP 양성 신경섬유의 관련성을 알아보하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1) 실험 재료

250~300g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 15마리를 암수 구별없이 사용하였다.

일차항체로는 rabbit anti CGRP(Sigma Co., U.S.A.)를, 이차항체로는 biotinylated antirabbit IgG(Sigma Co., U.S.A.)를 사용하였으며, ABC kit(Vector Lab. U.S.A.)를 이용하여 염색하였다.

2) 실험군 분류 및 조직처리

정상대조군에 3마리, 실험군에(치수노출후 2일, 4일, 7일, 10일 경과군)에 각 3마리씩 15마리를 배정하였다. 정상대조군은 치아에 손상을 가하지 않았으며, 실험군은 Ketamine (0.6ml/200g)으로 전신마취하고 상악 우측 대구치의 교합면의 중심구 부위를 고속 핸드피스 No. 1 round bur로 절삭하여 치수를 노출시킨 후, 노출된 상태로 구강내에 방치하였다.

실험군은 치수노출후 2일, 4일, 7일, 10일째에 ketamine으로 전신마취하여 흉강을 절개하고 좌심실에 삽관을 삽입한 후 heparin이 함유된 식염수로 관류한 다음 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS로 관류고정 하였으며, 정상대조군도 실험군과 같은 방법으로 조직처리를 시행하였다. 상악 우측 대구치를 악골과 함께 적출하여 4℃의 동일 고정액에 24시간 후고정하고, 15% formic acid에서 10일간 탈회시켰다. 냉동절편을 얻기 위하여 4℃의 30% sucrose에 12시간 방치한 후, O.C.T compound에 포매하여 -20℃의 Cryostat에서 50 μm의 두께로 박절하여 저장용액에 보관하였다.

3) 면역조직화학적 방법

조직절편을 multiwell plate에 넣어 0.1M phosphate buffer로 2분간 3회 가볍게 흔들어 흡수하고, 0.9% H₂O₂로 20분 처리하여 내인성 과산화효소를 차단하였으며, 0.1M PBS로 2분간 3회 수세하였다. 비특이적 반응을 없애기 위해 10% normal goat serum(0.1% Triton-X 100 in 0.01M PBS)에서 20분간 반응시켰다. 일차항체로는 rabbit anti CGRP(1:2000 in 0.01M PBS)를 사용하여 4℃에서 48시간동안 반응시키고 0.1M PBS로 2분간 3회 수세하였다.

이차항체로 biotinylated antirabbit IgG(1:200 in 0.01M PBS)를 사용하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 다음으로 0.1M PBS로 2분간 3회 세척한 후, ABC (avidin-biotin peroxidase complex)로 실온에서 30분간 반응시키고, 0.05% 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색하였다. 그후 일정한 과정을 거쳐 glycerol로 봉입하고 광학 현미경(Olympus BHS 313, Olympus Co., Japan)하에서 CGRP양성 신경섬유의 분포부위 및 염색정도를 관찰하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 정상대조군

손상을 가하지 않았던 치아의 치수에서는 CGRP함유 양

성신경섬유가 치근의 장축을 따라 평행하게 주행하여 치관부 치수에 이르는 양상이 관찰되었다(Fig. 1). 치관부 치수에서 이들 CGRP함유 양성신경섬유는 조상아세포층 하방의 Raschkow plexus에서 망상형태로 분포되었다(Fig. 1).

2. 실험군

1) 2일 경과군

교합면 삭제로 인하여 치수가 노출된 치수우각 부위에서 치아표면의 조직 잔사가 관찰되었다(Fig. 2). 노출은 되었으나 아직 괴사되지 않은 치수우각 하부에서는 급성염증세포의 침윤이 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 3). 손상을 받았으나 치수노출이 되지 않은 치수우각 하부에서는 급성염증부위 주위, 특히 신경총 부위에 CGRP함유 양성신경섬유의 반응도가 증가된 상태가 관찰되었다(Fig. 4).

2) 4일 경과군

심한 손상을 받은 교두에는 치수우각의 많은 부분이 괴사되고 치수쪽으로 더욱 확장된 소견을 보였다(Fig. 5, 6). CGRP함유 양성신경섬유는 괴사부위 근처의 치수조직에서 반응도가 증가하였고 섬유가 염증부위에 황으로 분포하였으며 염증대로의 가지는 관찰되지 않았다(Fig. 7). 손상이 가해진 부위 하방의 치수강 부위에서 CGRP함유 양성신경섬유의 분포는 치밀하고 진한게 염색된 망상구조와 현저한 양성신경섬유의 발아를 보였다(Fig. 5). 또한 조상아세포층을 지나 상아질에 접한 CGRP함유 양성신경섬유도 관찰되었다(Fig. 6).

3) 7일 경과군

심하게 손상된 치아에서는 치관 부위 치수의 전체에서 괴사를 보이며 치근의 잔존 치수에서 CGRP함유 양성신경섬유의 발아가 관찰되었다(Fig. 8, 10). 괴사부위에 접한 염증부위 하방에서 발아신경섬유의 분포는 염증부위에 근접하여 나타났으며, 염증부위로의 CGRP함유 양성신경섬유가 침투한 양상을 보였다(Fig. 9, 11).

4) 10일 경과군

약한 치수노출 후 10일이 경과한 치수에서는 염증 부위 주위로 섬유성 피막이 형성되었고 생활력을 유지하고 있는 피막 주위의 치수강에서 CGRP함유 양성신경섬유의 분포가 증가되었다(Fig. 12, 13).

치수노출이 많았던 10일 경과군에서는 치수강 부위의 치수가 괴사되고 괴사부위 하방에 농양이 형성되어 치근단 부위까지 확장되었다. 치근관 부위에서도 CGRP함유 양성신경섬유가 관찰되지 않았다(Fig. 14).

IV. 총괄 및 고안

신경펩타이드(neuropeptide)는 신경계에서 신경전달물질이나 신경조절물질로 작용하는 신경단백으로서 현재까지 약 30여종이 알려졌으며, 치수에서는 substance P(SP)¹⁻³⁾, calcitonin gene-related peptide (CGRP)²⁻⁶⁾, neurokinin A(NKA)^{7,8,13)}, neuropeptide Y(NPY)^{10,11)}와 vasoactive intestinal peptide(VIP)^{13,28)} 등이 발견되어 이들의 기원 및 작용, 상호관계를 규명하기 위한 많은 연구가 진행되어오고 있다.

신경펩타이드의 하나인 CGRP는 calcitonin과 같은 유전자에서 변형된 RNA 전사 과정에서 발견되는 37개의 아미노산으로 이루어진 신경펩타이드로서¹⁵⁾, 삼차신경의 감각신경섬유를 따라 치수에 분포하고, C섬유와 A 섬유에 존재하여 통각에 관여하는 것으로 알려진 SP와 함께 통각의 전도에 중요한 역할을 담당하며 혈관확장과 histamine분비를 촉진하여 신경성 염증조절 역할을 한다고 보고되었다²¹⁻²³⁾.

치아 손상의 정도에 따라 치수반응을 연구한 선학들의 보고에서, Taylor와 Byers²⁴⁾는 흰쥐 대구치의 치경부에 얇은 5급 와동을 형성하고 산부식하여 중등도의 손상을 가했을 때, 손상초기에 치수조직내 미세농양의 형성과 CGRP면역반응섬유분포가 증가되다가 시간이 지남에 따라 점차적인 치유양상과 수복상아질의 형성 및 발아된 신경섬유의 정상적인 회복을 보고하였다. 치수노출을 동반한 심한 손상에 대한 치수반응에 관하여 Kimberly와 Byers¹²⁾는 흰쥐 대구치 치수노출시 치수염증에 대한 CGRP를 함유한 신경섬유의 반응을 연구하여 보고하였으며, Khayat 등⁵⁾도 염증에 대한 감각신경섬유의 반응을 알아보기 위해 치수노출 후 시간에 따른 CGRP함유 양성신경섬유의 반응을 보고한 바 있다.

손상과 염증반응의 정도에 따라 치수조직내 신경섬유의 반응을 연구한 Byers 등⁴⁾은 치경부에 와동을 형성하여 미약한 손상을 가한 뒤 4일 경과군에서 인접 조상아세포층과 상아질에 CGRP함유 신경섬유의 발아가 나타났으나 3주 뒤 정상으로 되돌아왔으며, 와동에 산부식을 하여 중등도의 손상을 가한 경우 조상아세포층의 손상과 미세농양이 형성되었고 농양주위에 CGRP함유 신경섬유의 발아와 수복상아질의 형성이 관찰되었으며, 치수노출의 심한 손상을 가했을 때 심한 괴사조직이 형성되었고, 치수농양과 괴사가 점진적으로 진행되어가는 단계에서 CGRP함유 신경섬유는 농양과 치수조직사이, 병소가 형성되는 시기의 치근단주위조직, 만성 농양주위에서 발아되어 나타났다고 보고하였다. 또한 Byers와 Taylor²⁵⁾는 흰쥐 대구치에서 하치조신경의 절단유무에 따른 치수노출 후 치수생활력과 초기 치수반응에 대해 연구하여 치수 감각신경과 신경단백의 역할에 대한 분석을 하였고, Fristad²⁸⁾는 하치조신경의 절단 3주후에 VIP를

함유하는 신경섬유를 대구치의 치수와 치근단의 치주조직에서 관찰하였으며, 일부 VIP함유 신경섬유는 SP와 같이 공존함을 보고한 바 있다. 김¹⁶⁾은 A 섬유의 자극시 치수의 혈류에 큰 영향을 주지 않으나 C섬유의 자극시에는 C신경섬유의 말단에서 분비되는 SP에 의해 치수의 혈류량이 증가하였다고 보고하였고, Olgart 등²²⁾은 치수조직내의 교감신경에 존재하는 NPY와 noradrenaline은 혈관수축에 관여하며 치수조직내 존재하는 VIP는 혈관 확장효과를 나타내어 치수에 자극을 가했을 때 치수혈류의 흐름을 증가시켜 치수의 방어기전에 중요한 역할을 할 것으로 보고한 바 있다. 또한 Goodis와 Saeki⁷⁾는 손상받지 않은 사람의 제 3 대구치에서 Bradykinin, SP와 NKA를 관찰하였고, Itotagawa 등²⁹⁾은 정상적인 삼차신경절에서 NPY-IR ganglionic cells을 관찰할 수 없었지만, 흰 쥐 대구치의 치수노출 후 삼차신경절에서 NPY 면역세포를 관찰하였다고 보고하였다. Grutzner 등²⁰⁾은 치수조직에서 상대적으로 높은 농도를 나타내는 신경펩타이드인 CGRP와 SP의 치수손상시 양적인 평가를 시행하여, 치수노출 후 SP는 약 10%, CGRP는 약 45%가 감소하였으며, 와동형성과 산부식처리 후 SP는 약 10 - 20%, CGRP는 약 60%가 감소하여 나타났다고 보고하여 치수조직의 신경단백은 손상에 대해 반응하는 동적인 구조라 하였다. 한편, 국내에서 신경펩타이드에 대한 연구로는 삼차신경절에서 하치조신경의 손상에 대하여 CGRP함유 신경섬유의 분포를 관찰한 연구들이 보고되고 있으나^{16,17)}, 치아 손상에 따른 치수조직내 CGRP함유 신경섬유의 분포를 관찰한 연구들에 대한 보고는 다소 미약하기에, 본 연구에서는 치수노출에 의한 심한 치아손상시 치수의 반응정도를 규명하기 위해 치수의 신경단백중 가장 많이 분포하는 것으로 알려진 CGRP함유 신경섬유의 치수노출후 시간경과에 따른 분포변화 및 치수의 염증반응 양상을 알아보고자 흰쥐 상악 대구치 치수를 노출시키고 2, 4, 7, 10일 경과후 CGRP양성 신경섬유의 분포를 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

본 연구의 정상대조군에서 CGRP함유 신경섬유는 치근의 장축을 따라 평행하게 주행하며, 치관부 치수에서 조상아세포층 하방의 신경총에서 망상형태의 분포양상을 보였는데, Byers 등⁴⁾, Swift 등³⁰⁾과 Khayat 등⁵⁾의 손상을 가하지 않은 정상대조군에서도 이와 유사한 분포양상을 보였으나 일부 신경섬유들이 조상아세포층과 상아전질을 통과하여 상아세관 안으로 약 100 μ m까지 존재함을 보고한 소견과는 다소 차이가 있었다.

본 연구의 2일 경과군에서 관찰된 치수 우각부에서의 괴사조직층 및 급성 염증세포 침윤양상은 흰 쥐 하악 제 1대구치의 치수를 노출시키고 hematoxylin-eosin으로 염색하여 치수노출 후 1일째 치수 노출부위에 인접한 치수조직의 괴사와 치수조직 상부에서의 염증세포 침윤을 보고한

Yamasaki 등³¹⁾의 결과와 일치하였다. 치수노출 후 1일 경과군에서 손상받은 부위로부터 100 μ m까지 감염물질이 존재하는 조직괴사층과 이에 인접한 부위에 급성염증세포의 침윤을 보이는 염증대가 100 μ m까지 존재하나 정상적인 CGRP양성 신경섬유의 분포를 보고한 Khayat 등³⁾의 연구 소견과는 다소 차이가 있었다. 이러한 차이는 치수노출의 심도와 치수노출후 시간이 경과하면서 점차적으로 급성염증 반응과 함께 CGRP양성 신경섬유의 분포가 증가되었기 때문으로 생각된다. 한편 본 연구에서 치수가 노출되지 않고 상아질만이 삭제된 치수 우각부 하방의 급성염증부 주변 신경총 부위에서 CGRP 양성섬유가 증가된 양상을 보였으며, 이는 흰쥐 대구치의 치근에 얽은 와동을 형성하여 상아질 손상을 가한뒤 1일 경과 후에 손상부 주위에서 CGRP양성 신경섬유의 미약한 증가를 보고한 Taylor와 Byers²⁴⁾의 소견과 유사하였다.

본 연구의 4일 경과군에서 치수조직의 괴사가 치수강 하방으로 확산되고 괴사층에 인접한 부위에서 치밀하고 진하게 염색된 망상구조의 양성섬유 분포와 현저한 양성섬유의 발아를 보였으며, 7일 경과군에서는 치관부 치수 전체에서 괴사를 보이고 치근의 잔존 치수에서 CGRP 양성섬유의 발아가 염증조직의 하방에서 나타났으며 일부 신경섬유가 염증조직내에서 관찰되었다. 이와 유사한 소견으로 Khayat 등⁵⁾은 흰쥐 대구치 치수노출 후 5일째에 CGRP양성 신경섬유의 분포 및 발아가 가장 현저하였으며, 치근부 치수에서는 양성섬유가 측방분지를 내는 수지상의 분포양상을 나타내었다고 보고하였고, Kimberly와 Byers¹²⁾는 치수노출 후 6일째에 가장 많은 CGRP 양성신경섬유의 분포 증가를 관찰한 바 있다. 치수노출 없이 상아질에 손상을 가한 Taylor와 Byers²⁴⁾ 및 Byers 등⁴⁾의 연구에서도 4일째에 CGRP면역 반응 섬유의 분포증가 및 현저한 발아를 관찰하여 보고하였으며, 본 연구의 7일 경과군에서 염증조직내 신경섬유의 존재에 대해 Torneck³²⁾도 신경섬유가 염증세포에 대한 보호막으로 작용하는 견고한 교원질 섬유에 둘러싸여 염증조직내 신경섬유가 존재한다고 전자현미경을 이용한 실험에서 보고한 바 있다. 이와같은 양성섬유의 분포증가와 현저한 발아양상은 치아손상에 따라 유발된 치수의 염증반응에 대한 CGRP함유 신경섬유의 염증조절 역할로 사료된다.

Kimberly와 Byers¹²⁾는 손상의 심도에 따라 CGRP양성 신경섬유의 분포에 차이가 있으며, 치수노출 후 35일째에 대부분의 치아에서 치수괴사를 보였으나 일부에서는 치근단 부위의 치수가 생존하여 많은 CGRP양성 신경섬유가 관찰됨을 보고하였는데, 본 연구의 10일 경과군에서도 약한 치수노출의 경우는 염증부위 주위로 섬유성 피막이 형성되었고 생활력을 유지하고 있는 피막 주위의 치수강에서 CGRP 양성섬유의 분포가 증가한 반면, 치수손상이 심한

경우 치수강 부위의 치수가 괴사되고 괴사부위 하방에 농양이 형성되어 치근단 부위까지 확장되었으며 근관 부위에서 양성섬유는 관찰되지 않아 손상의 심도에 따라 치수조직의 반응정도가 다양하게 나타남을 확인할 수 있었다. 본 연구의 실험군에서 급성염증을 보이는 조직내에 CGRP양성 신경섬유의 퇴화가 발견된 반면, 인접부위에서는 많은 CGRP 양성신경섬유가 관찰된 바, Cajal³³⁾의 연구결과에서 신경성장이 염증조직에서는 억제되지만 바로 인접한 부위에서 자극된다는 보고와 일치하였다. 이와 같은 소견은 치수 손상 후 손상의 정도에 따라 치수내 신경섬유 및 CGRP 양성 신경섬유의 분포가 달라지고, 염증의 진행속도 및 생활력의 회복에도 영향을 주는 것으로 사료된다.

이상과 같이 본 연구에서 흰쥐 대구치의 교합면을 삭제하여 치수를 노출시킨 뒤 염증의 진행양상과 CGRP양성 신경섬유의 분포를 관찰한 결과, 급성염증 반응시 CGRP양성 신경섬유의 분포가 가장 많이 증가하였으며, 염증조직 주위에서 CGRP함유 양성신경섬유와 혈관의 분포가 증가하므로써 치수내에서 염증의 진행과정에 CGRP양성 신경섬유의 역할을 추정할 수 있었다. 또한 손상이 경미할 경우 염증조직은 섬유성 피막에 둘러싸여 치수조직의 생활력을 유지시키며, CGRP양성 신경섬유의 분포가 차츰 정상으로 되돌아 오는 반면, 심한 손상의 경우 염증은 치근단공을 넘어 치근단조직으로 확산되었다. 이와 같이 손상의 정도에 따라 염증반응은 다양하게 나타나며, 손상에 대해 치수의 신경섬유는 정적인 상태의 구조가 아니라 염증에 대해 빠르게 변화할 수 있는 구조로서 병소의 가장자리에서 CGRP와 같은 신경펩타이드는 치수조직의 치유반응에 관여하는 것으로 여겨진다.

향후 치수조직내에서 신경펩타이드의 역할을 명확히 규명하기 위해서는 치수에 존재하는 다른 신경펩타이드의 작용 및 상호관계에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

치수노출에 의한 심한 치아손상시 치수의 반응정도를 규명하기 위하여 치수노출 후 시간경과에 따라, 치수의 신경단백중 가장 많이 분포하는 것으로 알려진 CGRP함유 신경섬유의 분포변화 및 치수의 염증반응 양상을 알아보고자 흰쥐의 상악 대구치 치수를 노출시키고 2, 4, 7, 10일 경과후 CGRP함유 신경섬유의 분포를 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상대조군에서 CGRP함유 양성신경섬유는 치근의 장축을 따라 평행하게 주행하며, 치관부 치수에 도달하여 조상아세포층 하방의 신경총에서 망상형태로 분포하였

다.

- 치수노출후 2일 경과군에서 조직괴사와 급성염증이 나타나고 신경총 부위에서 CGRP함유 양성신경섬유의 반응도가 증가하였고, 4일 경과군에서 괴사조직이 치수쪽으로 확산되고 CGRP양성 신경섬유는 염증부 주위에 분포하였다.
- 치수노출후 7일 경과군에서 치관부 치수의 괴사와 10일 경과군에서 괴사된 치수하방에 농양이 형성되어 치근단 부위까지 확산되었으며 근관에서 CGRP함유 양성신경섬유는 관찰되지 않았다.
- CGRP 양성신경섬유의 발아는 4일 경과군의 손상하부 치수강 부위에서 가장 현저하였고, 7일 경과군의 괴사된 치수하방 염증부위 및 10일 경과군의 치근부 잔존 치수에서 나타났다.

이상과 같이 치수노출후 형성된 염증조직 주위에 CGRP 함유 양성신경섬유의 분포가 정상대조군에 비하여 전체적으로 증가하는 양상을 관찰하였으며, 특히 급성 염증조직 주위에서 CGRP함유 양성신경섬유가 크게 증가하여 치수조직내 염증반응 조절에 관여하는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Brodin, E., Gazelius, B., Olgart, L. and Nilsson, G. : "Tissue concentration and release of substance P like immunoreactivity in the dental pulp," *Acta. Physiol. Scand.*, 111:141-149, 1981.
- Gazelius, B., Edwall, b., Olgart, L., Lundberg, J. M., Hokfelt, T. and Fiscer, J. A. : "Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGPR) and substance P in sensory neurons of cat dental pulp," *Actaphysiol. scand.*, 130:33-40, 1987.
- Okiji, T., Jontell, M., Belichenko, P., Dahlgren, U., Bergenholtz, G. and Dahlstrom, A. : "Structural and functional association between substance P and Calcitonin Gene-related Peptide-immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp," *J. Dent. Res.*, 76(12):1818-1824, 1997.
- Byers, M. R., Taylor, P. E., Khayat, B. G. and Kimberly, C. L. : "Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves," *J. Endodon.*, 16:78-84, 1990.
- Khayat, B. G., Byers, M. R., Taylor, P. E., Mecifi, K. B. and Kimberly, C. L. : "Responses of nerve fibers to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by CGRP immunocytochemistry," *J. Endodon.*, 14:577-587, 1988.
- Uddman, R., Grunditz, T. and Sundler, F. : "Calcitonin gene-related peptide: a sensory transmitter in dental pulp?," *Scand. J. Dent. Res.*, 94:219-224, 1986.
- Goodis, H. and Saeki, K. : "Identification of bradykinin, substance P, and neurokinin A in human dental pulp," *J. Endodon.*, 23(4):201-204, 1997.
- Wakisaka, S., Ichikawa, H., Nishikawa, S., Matsuo, S., Takano, Y. and Akai, M. : "Neurokinin A-like immunoreactivity in feline dental pulp : its distribution, origin and coexistence with substance P-like immunoreactivity," *Cell Tissue Res.*, 251:565-569, 1988.
- Wakisaka, S. and Akai, M. : "Immunohistochemical observation on neuropeptides around the blood vessel in feline dental pulp," *J. Endodon.*, 15(9):413-416, 1989.
- Byers, M. R. : "Dynamic plasticity of dental sensory nerve structure and cytochemistry," *Archs oral Biol.*, 39:13-21, 1994.
- Uddman, R., Grunditz, T. and Sundler, F. : "Neuropeptide Y: occurrence and distribution in dental pulp," *Acta Odontol. Scand.*, 42:361-365, 1983.
- 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.
- Wakisaka, S. : "Neuropeptides in the Dental Pulp: Distribution, Origins, and Correlation," *J. Endodon.*, 16:67-69, 1990.
- Amara, S. G., Jonas, V. and Rosenfeld, M. G. : "Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products," *Nature*, 298:240-244, 1982.
- Rosenfeld, M. G., Mermod, J. J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., Vale, W. W. and Evans, R. M. : "Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing," *Nature*, 304:129-135, 1983.
- 김명국 백기석 이승표 : "흰쥐에서 안와하신경을 절단한 후 삼차 신경절에서의 calcitonin gene-related peptide 면역반응세포의 분포에 관한 연구," [대한구강해부학회지] 20(1):1-4, 1996.
- 박종섭 이승표 백기석 : "흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차 신경절에서의 calcitonin gene-related peptide 면역반응세포의 분포에 관한 연구," [대한구강해부학회지] 19(1):1-6, 1995.
- Copray, J. C. V. M., Ter Horst, G. J., Liem, R. S. B. and Van Willigen, J. D. : "Neurotransmitters and neuropeptide within the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: an immunohistochemical analysis," *Neurosci.*, 37:399-411, 1990.
- Deleon, M., Covenas, R., Chadi, G., Narvaez, J. A., Fuxe, K. and Cintra, A. : "Subpopulation of primary sensory neurons show coexistence of neuropeptides and glucocorticoid receptors in the rat spinal and trigeminal ganglia," *Brain Res.*, 636:338-342, 1994.
- Grutzner, E. H., Garry, M. G. and Hargeaves, K. M. : "Effect of injury on pulpal levels of immunoreactive substance P and immunoreactive calcitonin gene-related peptide," *J. Endodon.*, 18:553-557, 1992.
- Brain, S. D., Williams, T. J., Tipins, J. R., Morris, H. R. and MacIntyre, I. : "Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator," *Nature*, 313:54-56, 1985.
- Olgart, L. M., Edwall, B. and Gazelius, B. : "Neurogenic mediators in control of pulpal blood flow," *J. Endodon.*, 15(9):409-412, 1989.
- Syngcuk, K. : "Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation," *J. Endodon.*, 16(2):48-53, 1990.
- Taylor, P. E. and Byers, M. R. : "An immunocytochemical study of morphological reaction of nerves containing calcitonin gene-related peptide to microabscess forming and healing in rat molars," *Archs oral Biol.*, 35:629-638, 1990.
- Byers, M. R. and Taylor, P. E. : "Effect of sensory denervation on the response of rat molar pulp to exposure injury," *J. dent. Res.*, 72:613-618, 1993.
- Lee, Y., Takami, K., Kawai, Y., Girgis, S., Hillyard, C. J., MacIntyre, I., Emson, P. C. and Tohyama, M. : "Distribu-

- tion of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with substance P," *Neuroscience*, 15(4):1227-1237, 1985.
27. 이원택 이명식 이종은 박경아 : "흰쥐에서 치수신경 등쪽뿌리 절단후 등쪽뿌리의 substance P 및 calcitonin gene-related peptide 함유 신경섬유에 대한 면역조직화학적 연구," [대한 해부학회지] 27:306-320, 1994.
28. Fristad, I., Jacobsen, E. B. and Kvinnsland, I. H. : "Co-expression of vasoactive intestinal polypeptide and substance P in reinnervating pulpal nerves and in trigeminal ganglion neurones after axotomy of the inferior alveolar nerve in the rat," *Archs oral Biol.*, 43:183-189, 1998.
29. Itotagawa, T., Yamanaka, H., Wakisaka, S., Sasaki, Y., Kato, J., Kurisu, K. and Tsuchitani, Y. : "Appearance of neuropeptide Y-like immunoreactive cells in the rat trigeminal ganglion following dental injuries," *Archs oral Biol.*, 38(8):725-728, 1993.
30. Swift, M. L. and Byers, M. R. : "Effect of aging on responses of nerve fibers to pulpal inflammation in rat molars analyzed by quantitative immunocytochemistry," *Archs oral Biol.*, 37:901-912, 1992.
31. Yamasaki, M., Kumazawa, M., Kohsaka, T., Nakamura, H. and Kameyama, Y. : "Pulpal periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats," *J. Endodon.*, 20:13-17, 1994.
32. Torneck, C. : "Changes in the fine structure of the human dental pulp subsequent to carious exposure," *J. Oral Pathol.*, 6:82-95, 1977.
33. Cajal, S. R. : "Degeneration and Regeneration of the Nervous System," New York : Hafner, 1:354-355, 1959.

사진부도 설명

- Fig. 1. 정상대조군(×40)
CGRP함유 양성신경섬유는 신경총에서 망상형태로 분포되었다.
- Fig. 2. 실험 2일 경과군(×40)
치수노출된 치수 우각 하부에 과사조직층이 나타났다.
- Fig. 3. 실험 2일 경과군(×100)
과사되지 않은 치수우각하부에서 급성염증세포의 침윤이 뚜렷이 관찰되었다.
- Fig. 4. 실험 2일 경과군(×100)
치수노출되지 않은 치수 우각 하부에서 급성염증부위, 특히 신경총 부위에 CGRP함유 양성신경섬유의 반응도가 증가되어 관찰되었다.
- Fig. 5. 실험 4일 경과군(×40)
과사조직층이 더욱 치수강저로 확장되어 나타나며, 주위조직에 CGRP함유 양성신경섬유의 분포가 더욱 치밀하게 염색되어 관찰되었다.
- Fig. 6. 실험 4일 경과군(×200)
조상아세포층을 지나 상아질에 접한 CGRP함유 양성신경섬유가 관찰되었다.
- Fig. 7. 실험 4일 경과군(×200)
과사부위 주위의 치수조직에서 CGRP함유 양성신경섬유의 분포가 염증조직에 황으로 증가되어 관찰되었다.
- Fig. 8. 실험 7일 경과군(×40)
치수강 전체에서 과사를 나타내며, 치근의 잔존치수에서 CGRP함유 양성신경섬유의 발아가 나타났다.
- Fig. 9. 실험 7일 경과군(×100)
염증주위에 혈관의 분포가 증가되어 나타나며, 염증부위의 주위로 CGRP함유 양성신경섬유의 분포가 증가되어 관찰되었다.
- Fig. 10. 실험 7일 경과군(×40)
치근의 잔존 치수에서 CGRP함유 양성신경섬유의 수지상 분포를 보였다.
- Fig. 11. 실험 7일 경과군(×100)
염증부위의 CGRP함유 양성신경섬유의 존재가 관찰되었다.
- Fig. 12. 실험 10일 경과군(×40)
치수노출이 경미하여 염증주위로 피막이 형성되었으며 주위 치수조직은 생활력을 유지함이 관찰되었다.
- Fig. 13. 실험 10일 경과군(×100)
염증주위에 피막을 형성하고, 피막주위에 CGRP함유 양성신경섬유의 분포가 증가되어 나타났다.
- Fig. 14. 실험 10일 경과군(×40)
치수노출이 심하여 전체 근관내 치수조직이 과사되었으며, 치근단 부위까지 확장되었다.

사진부도 ①

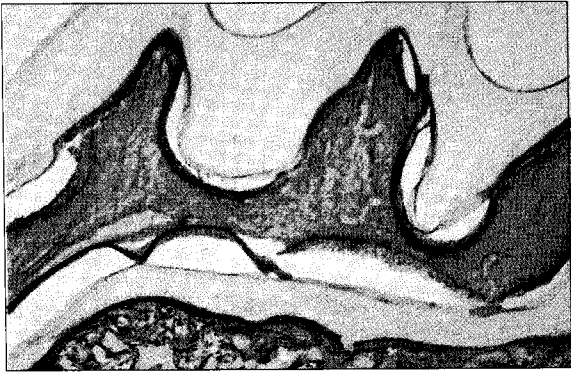


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

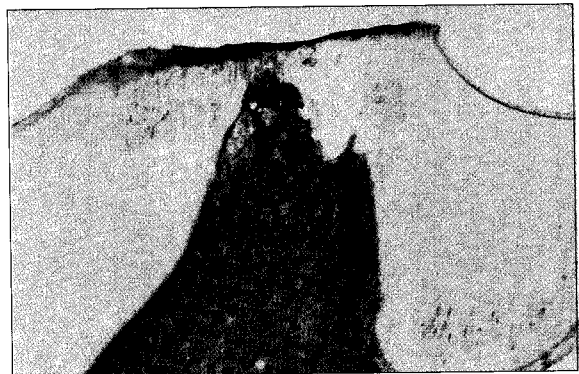


Fig. 4

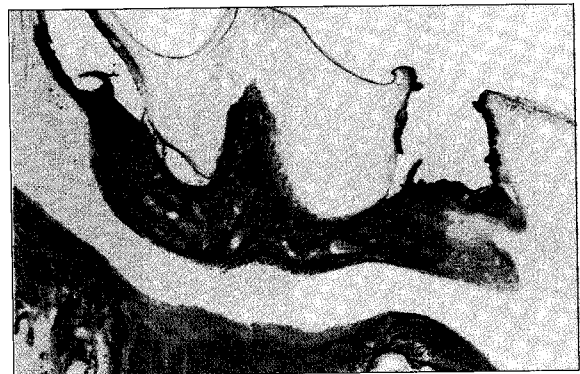


Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7

사진부도 ②



Fig. 8

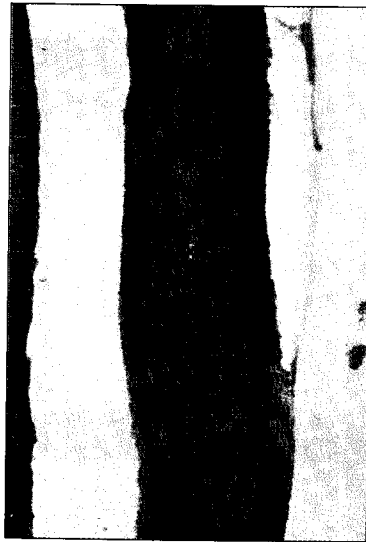


Fig. 9



Fig. 11



Fig. 10

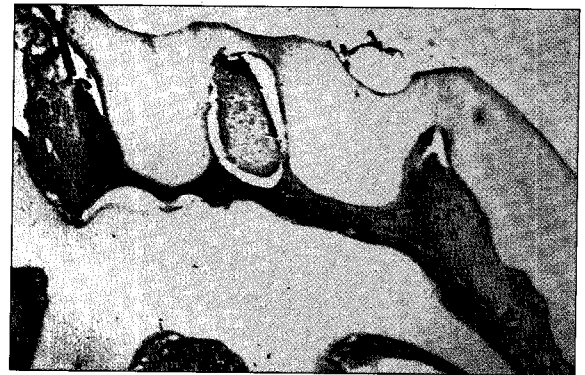


Fig. 12



Fig. 13



Fig. 14