

흰쥐의 발치와 재생피화에 따른 상피내 CGRP 면역양성 신경섬유의 분포변화

변기정* · 김진수

울산대학교병원 치과*, 경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

EVIDENCE OF INTRAEPITHELIAL CGRP IMMUNOREACTIVE NERVE FIBERS DURING REEPITHELIALIZATION OF EXTRACTION WOUND OF RAT

Ki-Jeong Byeon*, Chin-Soo Kim

*Department of Dentistry, Ulsan University Hospital**

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyungpook National University

The purpose of this study was to investigate the distribution pattern of CGRP immunoreactive nerve fibers in the healing mucosa of extraction wound. Maxillary 1st molars of rats were extracted. All extraction sites and adjacent tissues of 3 groups of rats(1-week, 2-week and 4-week groups) were removed en bloc and processed for immunostaining and were subjected to light microscopic examination.

The results obtained were as follows;

In 1-week group, there was no difference in the distribution pattern of CGRP immunoreactive nerve fiber between epithelial margin adjacent to extraction socket and normal gingival epithelium. In 2-week group, some CGRP-immunoreactive nerve fibers were seen in epithelial layer. In 4-week group, many intercellular CGRP immunoreactive nerve fibers were abundant in all layers of immature epithelium characterized by scab on the mucosa and thick keratinized cell layer with irregular surface. Intraepithelial CGRP immunoreactive nerve fibers were reduced to normal level in adjacent mature epithelium.

These results suggest that density of CGRP immunoreactive nerve fibers are increased transiently in epithelium during reepithelialization process and CGRP released from these nerve fibers may play an important role in the reepithelialization in the wound healing.

Key words : CGRP, Reepithelialization, Extraction socket

I. 서 론

구강점막은 피부와 소화기 점막의 중간에 위치하고 있으며 풍부한 신경섬유의 지배를 받고 있는데 이는 이 부위의 감각이 섭식 등 생존에 필요한 고유기능에 있어서 중요하게 작용하기 때문이다¹⁾. 또한 외과적 술식이나 치주술식 등에 의하여 구강점막은 손상을 받기 쉬우나 신체 다른 부위의 손상에 비하여 반흔의 형성이 거의 없고 쉽게 치유되는 특징을 가진다.

CGRP(Calcitonin gene - related peptide)는 Amara 등²⁾에 의하여 발견된 신경펩타이드로서 그 기능이 매우 다양하고, 특히 상피의 치유^{3,4)}, 염증 반응⁵⁾, 혈관 이완⁶⁾, 혈관 생성^{8,9)} 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 최근 면역조직화학기법의 발달과 더불어

신경섬유의 표식자(marker)로서 널리 사용되고 있는 물질이다. 최근 상처의 치유시 외부에서 CGRP나 SP(substance-P) 등을 투여하면 치유속도가 빨라지며 특히 손상된 각막의 치유시 국소적으로 CGRP를 투여하면 재생피화(reepithelialization)의 속도가 증가한다고 하였다^{4,5)}. 그리고 골결손부의 치유시에도 SP나 CGRP 면역양성 신경섬유의 분포가 증가하며¹⁰⁾ 구강점막의 치유시¹¹⁾ 혹은 흰쥐의 구치부 재식시¹²⁾ 등과 같은 손상된 조직의 치유에도 CGRP 면역양성 신경섬유의 분포가 변한다. 또한 접합상피(junctional epithelium) 등 빠르게 증식하는 조직의 상피내에서 다른 부위의 구강점막과 비교하여 높은 밀도의 CGRP 면역양성 신경섬유가 관찰되는데 이는 세포의 증식이나 조직의 치유와 관련이 있는 것으로 생각되고 있다.

발치와는 외상의 가장자리 사이가 멀리 떨어져 있으므로 외상의 가장자리가 인접한 일차치유과정과는 달리 이차 치유과정의 특징을 가진다. 즉 발치와는 외상이 크고 외상주변 상피 가장자리 사이의 거리가 멀기 때문에 상피화도 다른 부위에 비하여 느리게 진행된다. 즉 구강내 간단한 절상시 24시간내에 상피화가 진행되지만 발치와의 상피화는 발치와가 육아조직(granulation tissue)으로 차고 난 이후인 둘째 주부터 시작되어 4주경에 완성

변 기 정

682-060, 울산광역시 동구 전하동 290

울산대학교병원 치과

Ki-Jeong Byeon

Department of Dentistry, Ulsan University Hospital

290, Chonha-Dong, Dong-Gu, Ulsan, 682-060, Korea

Tel: 82-52-250-7230 Fax: 82-52-250-8078

된다고 알려져 있다. 그 과정은 연결성이 파괴된 상처의 가장자리 부위에서 상피세포의 역분화(dedifferentiation)가 일어나 세포의 형태가 바뀌고 아메바 운동을 하면서 상처부위를 덮게된 후 다시 중층편평상피(stratified squamous epithelium)를 형성하는 것이다¹³⁾.

이와 같이 넓은 부위에 걸쳐서 긴 시간 동안 상피화가 진행되기 때문에 발치와의 치유는 상피화 또는 상피세포의 증식과정에 있어서 CGRP 면역양성 신경섬유의 관련여부 등을 형태학적으로 관찰할 수 있는 좋은 모델로 사료된다. 따라서 본 실험의 목적은 흰쥐에서 발치후 치유과정 중 상피화가 일어나는 기간 동안 점막에서 CGRP 면역양성 신경섬유의 재생양상을 관찰하고 상피세포 증식과의 관련성 등 그 의의를 해명하는 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물의 처리

몸무게 300g 내외의 흰쥐 12마리를 각 4마리씩 1주군, 2주군 및 4주군으로 나눈 다음 각각 sodium pentobarbital(40mg/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 뒤 삼각 제1대구치를 잘라하였다. 각 군마다 일정 생존기간이 지난 후 과량의 sodium pentobarbital(60mg/kg)을 복강내 주사하여 깊게 마취시킨 뒤 생리식염수 및 4% paraformaldehyde로 관류고정하여 발치와가 포함된 삼각 구치부를 조심스럽게 잘라낸 다음 동일한 고정액에 하루 동안 후고정시켰다. Kristensen 용액¹⁴⁾으로 4일간 탈회한 뒤 30% sucrose 용액에 넣어 4°C에서 하루 동안 두어 침적시켰다. 냉동절편기를 이용하여 25 μ m 두께로 연속절편을 만들어 gelatin을 입힌 슬라이드에 붙인 다음 실온에서 말렸다.

2. 면역조직화학기법

건조된 각 절편을 습윤용기에서 0.1M PB(phosphate buffer)로 10분간 2회 세척하여 고정액 및 탈회액을 씻어낸 후 다시 0.05M PBS(phosphate buffered saline)로 10분간 3회 세척하였다. 비특이적 반응을 억제하기 위하여 4% normal goat serum (in 0.3% triton in 0.05M PBS)으로 실온에서 2시간 반응시킨 다음 일차항체(antiCGRP antibody, Amersham International plc, U.K.)를 2,400배로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 4°C에서 overnight하였다.

다음날 아침 다시 0.3% triton in 0.05M PBS로 3회 세척한 뒤 200배로 희석한 이차항체(goat antirabbit IgG, Vector사)를 이용하여 실온에서 2시간 반응시킨 다음 다시 0.3% triton in 0.05M PBS로 3회 세척하고 ABC(avidin biotin complex, Vector사)를 이용하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.3% triton in 0.05M PBS로 2회 세척하고 다시 0.05M PBS로 2회 세척한 다음 DAB를 이용하여 발색 반응을 시킨 뒤 실온에서 말린후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 면역반응에 대한 대조군으로서 일차항체 대신 0.05M PBS를 사용하여 아무런 반응이 나

타나지 않음을 확인하였다.

III. 결 과

흰쥐의 구강점막 특히 치은점막은 상피와 고유층(lamina propria)으로 구성되어 있었고 상피는 하부로부터 기저세포층(basal cell layer), 유극세포층(spinous cell layer), 과립세포층(granular cell layer), 각화세포층(keratinized cell layer) 등 네층으로 이루어져 있었으며 하방의 고유층은 유두층(papillary layer)과 망상층(reticular layer)으로 구성되어 있었다. 치은점막 전체에 있어서 많은 CGRP 면역양성 신경섬유가 분포되어 있었으며 신경섬유는 대부분 상피 하방의 고유층에 주로 존재하였고 간혹 신경섬유들이 상피층 내로 뻗어 있는 것이 관찰되었다.

1주군에서 발치와는 대부분 육아조직 및 혈병(blood clot)으로 채워져 있었고 상피화는 거의 진행되지 않은 상태였다. 2주군에서 발치와의 상피화는 어느 정도 진행되어 있었고 상피세포들이 육아조직의 상부를 따라 계속해서 중심부로 이동하는 양상을 나타내었다. 4주군에서 발치와의 상피화는 거의 진행된 상태이며 상피화가 먼저 진행된 가장자리 쪽의 점막은 상피층의 경계가 뚜렷하고 각화층의 두께도 거의 일정하여 인접치는 점막상피와 유사하였고 고유층의 형태, 특히 유두층의 형태가 인접 치은과 비슷하게 관찰되어 점막이 성숙된 양상으로 관찰되었다. 비교적 나중에 상피화가 이루어진 중심부의 함몰된 부위의 상피층은 인접 성숙한 상피층에 비하여 상피층의 경계가 뚜렷하지 않았는데 특히 각화층의 두께가 균일하지 않았으며 상방에 가피(scab)가 남아 있는 등 완전히 성숙되지 못한 양상을 나타내었다. 각 군에 있어서 CGRP 면역반응을 관찰한 결과는 다음과 같았다.

1 주군

발치와의 상방은 가피로 덮여져 있었고 상피화는 거의 진행되지 않았으며 상처의 가장자리 점막은 상피의 연속성이 끊어져 있었고 상피의 가장자리가 상처 중심부의 육아조직과 인접하고 있었다. CGRP 면역양성 신경섬유의 분포는 인접한 정상 치은 점막과 비교하여 별다른 차이를 보이지 않았다. 즉 상피층내에서 CGRP 면역양성 신경섬유는 거의 관찰되지 않았으나 고유층에서는 상당수의 신경섬유가 관찰되었다(Fig. 1).

2 주군

발치와의 상방은 가피로 덮여져 있었고 가피 하방에 상처부위의 가장자리부터 육아조직의 상방을 따라 중심부를 향하여 상피화가 진행되고 있었다. 가장자리 부위 상피세포의 전층에서 CGRP 면역양성 신경섬유가 관찰되기도 하였다. 이 신경섬유들은 뚜렷한 염주알 모양을 띠며 상피세포들 사이로 진행하고 있었다. 고유층에서는 많은 CGRP 면역양성 신경섬유가 관찰되었다(Fig. 2).

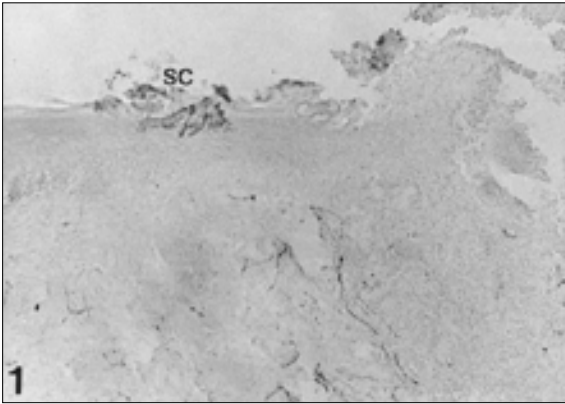


Fig. 1. Extraction socket of 1-week group. Mucosal margin adjacent to healing socket is seen. Some CGRP immunoreactive nerve fibers are seen in lamina propria but no CGRP immunoreactive nerve is seen in epithelium. Scabs(sc) are seen on the epithelium.

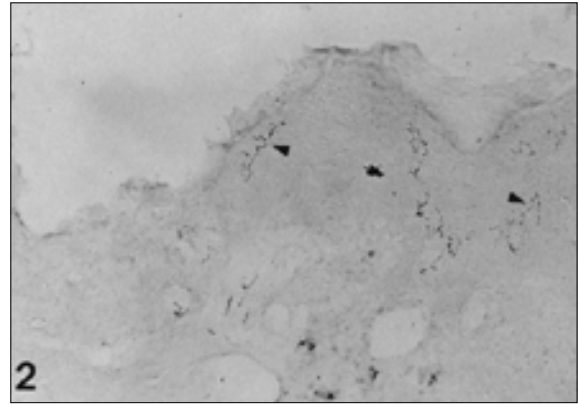


Fig. 2. Extraction socket of 2-week group. Mucosal margin adjacent to healing socket is seen. Intraepithelial CGRP immunoreactive nerve fibers (arrow heads) are seen in mucosal margin. These immunoreactive fibers are beaded appearance.

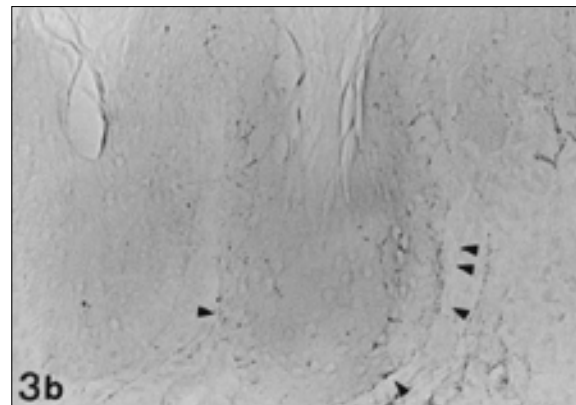
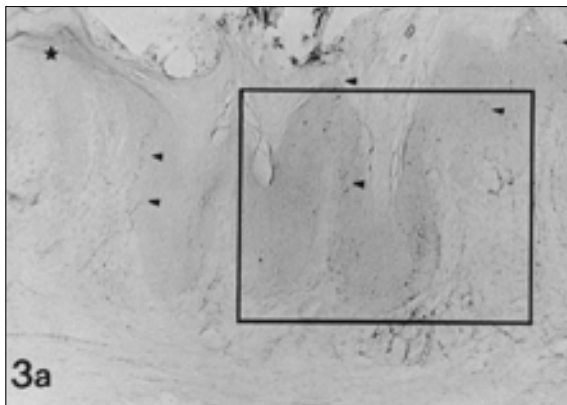


Fig. 3. Extraction socket of 4-week group is covered with epithelium. Many intercellular CGRP immunoreactive nerve fibers (arrow heads) are seen in all epithelial layers of immature epithelium characterized by scab(sc) on the mucosa and thick keratinized layer with irregular surface. But in adjacent mature epithelium (star), the density of intraepithelial CGRP immunoreactive nerve fibers are reduced to normal level (a). Fig. 3b shows magnified intraepithelial CGRP immunoreactive nerve fibers in the box of fig. 3a. Under basal cell layer many CGRP immunoreactive nerve fibers show beaded appearance (arrow heads). Branches of these fiber run into the epithelium.

4주군

발치와의 상피화가 거의 진행된 상태이며 상피화가 먼저 진행되어 상피층의 성숙이 거의 끝난 가장자리쪽의 점막은 CGRP 면역양성 신경섬유의 분포에 있어서 인접한 정상치은과 유사한 양상을 보였다. 중심부의 증식이 완전히 끝나지 않은 상피에서 상피의 전층에 걸쳐서 상피세포층내로 진행되는 많은 CGRP 면역양성 신경섬유가 관찰되었다(Fig 3a). 이런 상피세포내 신경섬유들은 연속절편의 대부분에서 관찰되었으며 2주군에 비하여 밀도가 상당히 증가되어 있었다. 또한 이 부위의 기저세포층 직하방에서 고밀도의 CGRP 면역양성 신경섬유가 관찰되었으며 이들이 기저세포층 사이로 진행되는 경우가 때때로 관찰되었다(Fig. 3b). CGRP 면역양성 신경섬유는 모두 뚜렷한 염주알 모양을 나타내고 있었다.

IV. 고 찰

본 실험에서 관찰한 치은점막에서는 정상적으로 상피층내에 CGRP 면역양성 신경섬유가 존재하였지만 부위에 따라 그 밀도에 있어서 차이를 보였는데 치은점막 중에서도 접합상피 등 증식이 활발한 부위나 치간 유두에서는 CGRP 면역양성 신경섬유의 밀도가 높은 반면 나머지 부위에서는 그다지 밀도가 높지 않았다. 발치와에서 상피화가 진행됨에 따라 상피세포층 사이에 CGRP 면역양성 신경섬유가 2주군부터 증가하였는데 이는 상피가 하방의 결합조직을 덮기 시작하는 시기와 거의 일치하였다. 그러나 4주군에서 상피층이 완전히 성숙함에 따라 다시 감소되는 양상을 보였다. 이와 같이 상피화의 진행과정에 있어서 상피세포층 사이의 CGRP 면역양성 신경섬유가 증가하였다가 상피층의 성숙과 더불어 다시 감소한 것은 상피세포의 증식과정에 있어서 신경펩타이드인 CGRP가 관여하였을 가능성을 보여주는 것

으로 생각된다. 또한 본 실험과 유사하게 실험적 조직 손상후 치유시 CGRP 면역양성 신경섬유의 증가에 관련된 많은 연구결과가 보고되고 있다. Tervo 등¹⁵⁾은 각막손상후 눈물에서 CGRP의 평균 농도가 증가함을 보고하였으며 Aoki 등¹⁶⁾은 골손상후 치유시 SP나 CGRP 면역양성 신경섬유가 증가하였다가 술후 24일경 다시 정상수준으로 감소한다고 하였다. Itotagawa¹⁷⁾는 경구개 점막의 치유시 2주째 CGRP 면역양성 신경섬유가 증가하였다가 4주째 감소한다고 하였고 또한 치은절제술을 시행한 치은에서 1주경부터 신경섬유가 증가하기 시작하여 4주경에서는 조직학적 형태 및 CGRP 면역양성 신경섬유의 분포가 인접 정상치은과 거의 비슷한 양상을 보인다고 하였다. 이와 같은 보고에서 부위에 따라 증가양상이나 시기는 조금씩 차이가 나지만 조직의 치유와 더불어 국소적으로 CGRP 면역양성 신경섬유 분포의 증가나 체액내 CGRP 농도가 증가하는 것은 CGRP가 상처의 치유에 관여한다는 증거가 될 수 있다고 사료된다.

또한 CGRP 등 신경펩타이드가 상처의 치유나 세포의 증식에 관여함을 더욱 직접적으로 증명해 주는 연구결과가 보고되고 있다. Khalil과 Helme⁹⁾은 상처의 치유시 외부에서 CGRP나 SP 등 신경펩타이드를 투여하면 상처의 치유가 훨씬 빨라지며 따라서 이와 같은 물질은 상처의 치유에 관여하는 신경조절인자(neuromodulator)로서 작용한다고 하였다. 그리고 Mikulee과 Tanelian⁹⁾은 CGRP의 국소적 적용시 손상된 각막의 재생피화가 빨라진다고 하였고 Bongehiellm 등¹⁶⁾은 흰쥐의 치수 섬유세포의 배양시 CGRP나 SP 등의 신경펩타이드가 세포의 성장을 조절하는 특징을 가진다고 하였으며 H gerstrand 등⁸⁾은 사람의 혈관내피세포의 배양시 CGRP가 세포의 증식을 촉진시킨다고 하였다. 이와 같은 보고들은 여러 종류의 세포에서 CGRP나 SP 등 다양한 신경펩타이드로 말미암아 성장이 조절됨을 증명해 주고 있다.

한편 상피화와 관련된 CGRP 면역양성 신경섬유는 대부분 염주알 모양을 하고 있었다. Sato 등¹⁷⁾에 의하면 이와 같은 염주알 모양의 신경섬유는 자율신경계에서 많이 관찰되며 염주알 부위에 주로 많은 신경전달물질이 포함되어 있다고 하였다. Maeda 등¹⁸⁾은 접합상피에서 관찰되는 상피내 신경섬유는 뚜렷한 염주알 모양을 나타내며 전자현미경으로 관찰한 결과 이런 염주알 모양의 구조물은 치밀연접소포(dense cored vesicle)를 비롯한 다양한 연접소포를 가지며 이런 연접소포들은 펩타이드성 신경전달물질을 함유하고 있을 것으로 보고하였다. 또한 Sato¹⁹⁾에 의하면 신경축삭에 염주알 모양이 나타나는 것은 신경의 재생이나 조직의 발육 중에 주로 많이 나타난다고 하였으며 본 실험에서도 상피화에 따른 점막 특히 상피층내에서 CGRP 면역양성 신경섬유가 증가되는 양상이 관찰된 것은 상피세포의 증식과 관련이 있다고 생각된다.

손상된 상피의 치유과정은 처음에는 상처부위가 혈병으로 덮이게 되고 가장자리 상피세포가 역분화과정을 거쳐 운동성을 가지게 되며 상처의 중심부로 이동하며 하방의 결합조직을 덮은 다음 성숙한 상피층을 형성한다고 알려져 있다. 이 과정에 CGRP, SP, NO(nitric oxide) 등 여러 물질이 작용하는 것으로

알려져 있으며^{3,9)} 본 실험의 결과로 미루어보아 상피의 치유과정시 CGRP는 상피세포들 사이에서 일시적으로 밀도가 증가된 신경말단으로부터 분비되어 국소적으로 농도를 증가시켜 2주경에 관찰된 상처부위를 덮는 상피세포의 이동이나 4주경에 관찰된 상피세포의 분열 및 성숙한 상피층의 형성 등 전체적인 재생피화 과정에 중요하게 작용할 가능성이 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ten Cate AR : Oral histology; Development, structure, and function, 4th ed. Mosby, Inc., St. Louis, 1994, pp 456-468.
2. Amara SG, Jonas V, Rosenfield MG, Ong ES and Evans RM : Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products, *Nature*, 298:240-244, 1982.
3. Benrath J, Zimmermann M and Gillardon F : Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin ; Evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation, *Neurosci. Lett.*, 200:17-20, 1995.
4. Khalil Z and Helme R : Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats, *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 51A:354-361, 1996.
5. Mikulee AA and Tanelian DL : CGRP increases the rate of corneal re-epithelialization in an in vitro whole mount preparation, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 12:417-423, 1996.
6. Kimberly CL and Byers MR : Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting, *Anat. Rec.*, 222:289-300, 1988.
7. Brain SD, Willaims TJ, Tippins JR, Morris HR and Macintyre I : Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator, *Nature*, 313:54-56, 1985.
8. H gerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzon B, Larsson O and Nilsson J : Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells, *Neurobiol.*, 87: 3299-3303, 1990.
9. Mitsuhashi M and Payan DG : The mitogenic effects of vasoactive neuropeptides on cultured smooth muscle cell lines, *Life Sci.*, 40:853-861, 1987.
10. Aoki M, Tamai K and Saotome K : Substance P and calcitonin gene-related peptide-immunofluorescent nerves in the repair of experimental bone defects, *Int Orthop.*, 18:317-24, 1994.
11. Itotagawa T : Immunohistochemical studies on the peptidergic nerve distribution in hard palate mucosa and gingiva of the rat 2. Responses of calcitonin gene related peptide(CGRP)-containing nerve fibers on wound healing of the mucosa, *Osaka Daigaku Shigaku Zasshi*, 35:110-27, 1990.
12. Kvinnsland I, Heyeraas KJ and Byers MR : Regeneration of calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in replanted rat molars and their supporting tissues, *Arch Oral Biol*, 36:815-26, 1991.
13. Avery JK : Oral development and histology, B.C. Decker Inc., Toronto, 1988, pp 282-292.
14. Kristensen HK : An improved method of decalcification, *Stain Technol.*, 23:151-154, 1948.
15. Tervo TM, Mertiniemi P, Ylatupa S, Tervo K, Virtanen T and Partanen P : Release of calcitonin gene-related peptide in tears after excimer laser photorefractive keratectomy, *J. Refract. Surg.*, 11:126-8, 1995.
16. Bongehiellm U, H gerstrand A, Theodorsson E and Fried K : Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts, *Regul. Pept.*, 60:91-98, 1995.
17. Sato O, Maeda T, Iwanaga T and Kobayashi S : Innervation of the incisors and periodontal ligament in several rodents: An immunohistochemical study of neurofilament protein and glia-specific S-100 protein, *Acta Anat.*, 134:94-99, 1989.
18. Maeda T, Sodeyama, T, Hara K and Takano Y : Evidence for the existence of intraepithelial nerve endings in the junctional epithelium of rat molars: An immunohistochemical study using protein gene product 9.5(PGP 9.5) antibody, *J. Periodontal Res.*, 29:377-385, 1994.
19. Sato O : Response of pulpal nerves to cavity preparation in rat molars : An immunohistochemical study using neurofilament protein(NFP) antiserum, *Arch. Histol. Cytol.*, 52:433-446, 1989.