

치성낭종 상피세포의 증식, 분화 및 세포능동사망현상에 관한 면역조직화학적 연구

정성훈 · 박영욱 · 주재용 · 이석근*

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 구강병리학교실*

Abstract

AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON PROLIFERATION, DIFFERENTIATION, AND APOPTOSIS IN THE EPITHELIAL CELLS OF THE ODONTOGENIC CYSTS

Seong-Hoon Chung, Young-Wook Park, Jae-Yong Joo, Suk-Keun Lee*

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Department of Oral Pathology,
College of Dentistry, Kangnung National University*

The epithelium of odontogenic cyst seems to be in a specific status of cellular proliferation and cytodifferentiation. With the identification of various genes, which play essential roles in the specific stages of cellular proliferation and differentiation, the cellular conditions of odontogenic cyst epithelium need to be reevaluated. This study aimed to estimate the degree of proliferating, differentiating and apoptotic activities of odontogenic cyst epithelium using antisera of PCNA, Ki-67, MPM-2, transglutaminase C, heat shock protein 70 and ApopTag® method in 19 cases of odontogenic cysts. Cellular changes of the cyst epithelium were measured by intensity of each immunohistochemical staining.

Results were as follows:

1. The proliferating activity of the cyst epithelium was slightly lower than that of normal oral mucosal epithelium, with the use of primary antibodies against PCNA, Ki-67, and MPM-2. And the proliferating activity of the epithelium in OKC group was even higher than that of the epithelium in non-OKC group.
2. The odontogenic cysts showed weakly positive reaction with transglutaminase C, but strongly positive reaction with HSP 70.
3. Occasionally, only a few apoptotic cell was observed in the superficial keratin layer of OKC.
4. The hyperplastic cyst epithelium infiltrated with mild inflammatory cells showed diffusely positive reaction with different proliferating factors.

From the above results, we presumed that the endogenous proliferating and differentiating activity of the cyst epithelium was slightly lower than that of normal oral mucosal epithelium, and also supposed that the cyst epithelium could be reactivated for the further proliferation by the exogenous factors, such as inflammatory reaction and any chemico-physical irritations.

Key words : Proliferation, Differentiation, Apoptosis

I. 서 론

악골에 발생하는 치성낭종은 구강악안면 영역에서 발생하는 가장 일반적인 질환 중의 하나이며 양성종양에 준하는 병소로서^{1,3)}, 크게 염증성 낭종과 발육성 낭종으로 나누어진다. 이들의 발생과 성장 기전은 아직 명확히 확립되지 않았으나 치성 낭종 모두는 치아형성 기관의 상피 잔사로부터 발생한다고 여겨지고 있다^{3,6)}. 즉, 치성낭종의 발생은 일반적으로 치배(tooth germ)에서 파

생되는 잔존 법랑 상피(reduced enamel epithelium)와 Malassez 상피잔사 등의 세포잔사가 동면 상태로 잔존해 있다가 불특정의 세포성 자극에 의한 재증식으로부터 기인하기 때문에 오래 전부터 잔존 치성 상피의 세포증식에 관한 논란이 계속되어 왔다^{2,8)}.

많은 선학들이 치성낭종 상피의 증식현상을 연구하여 온 바, 낭종상피의 증식에 따른 중심부의 괴사물질이 삼투압을 증가시킴으로써 체액, 특히 콜레스트롤과 같이 침투성이 강한 물질이 낭종 내부에 침투되어 상피가 낭종성 변형을 일으키는 것으로 알려져 있다^{3,9-11)}. 또한 낭종상피 내부에 생긴 세포 변형물질들은 낭종상피에 일정한 자극을 주게 되므로 낭종상피가 정상적인 세포분화를 하지 못하고 지속적인 팽윤 증식을 하게 된다고 생각되어져 왔다⁹⁾. 치성낭종 상피의 증식성은 일반적인 피부 상피세포의 증식과는 다른 환경적인 요인을 갖고 있으므로 비록 구강 상피 기원의 치성낭종 상피일지라도 정상적인 상피세포의 분화 과정을 갖지 못하는 현상을 보인다¹²⁻¹⁴⁾. 즉, 정상적인 피부 상피에

박 영 욱

210-702, 강원도 강릉시 지변동 123

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Young-Wook Park

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kangnung National Univ.

123, Chibyun-Dong, Kangnung, Kangwon-Do, 210-702, Korea

Tel. 82-033-640-3183 Fax. 82-033-640-3103

E-mail : ywpark@knusun.kangnung.ac.kr

비하여 기저세포층이 얇고, 망상돌출(rete peg)의 발육이 저조하며, 쉽게 유극세포(prickle cell)로 분화되지 못하고 각화상피가 바로 낭종 내부로 탈락되는 세포주기를 갖게 되므로 일반적으로 유극층이나 과립세포층(granular cell layer)이 얇은 것으로 관찰된다¹⁵⁻¹⁷. 유극세포나 과립세포는 상피세포의 각화과정이나 세포증식을 위하여 반드시 필요한 세포층이므로 이러한 특이한 구조를 보이는 치성낭종 상피에 관한 연구가 더욱 필요한 실정이다.

최근들어 세포주기와 관련된 여러 가지 단백질자 항체들이 개발됨으로써 치성낭종이나 치계증양의 증식성에 관한 연구는 활성화 되었다. 즉 PCNA(proliferating cell nuclear antigen), Ki-67, mitotic protein 등의 세포주기와 관련되는 단백질에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학적 연구결과들이 보고되어 왔다¹⁸⁻²⁰. 그리고 외부의 온도상승 등의 온도자극으로부터 세포들을 보호하기 위하여 발현이 증가되는 것으로 알려진 열충격단백질 70(heat shock protein 70)은 열충격뿐 아니라 염증, 자외선 조사, 독성 화학물질(toxic chemical)에의 노출과 같이 스트레스를 받았을 때에도 발현이 증가되는 스트레스 단백질로 알려져 있다^{25,26}. 또한 주로 세포질 내에서 작용하는 효소로서 세포들이 만들어낸 단백질의 구조화를 조절하기 위한 생화학적 반응에 필요한 transglutaminase²⁷ 역시 최근에 많이 연구되고 있는 세포분화와 관련된 인자이다. 그리고 손상되거나 불필요한 세포들을 제거하는 소위 “programmed cell death” 즉 세포능동사망현상(이하 apoptosis)에 대한 연구²⁸⁻³⁰들도 세포의 안정성을 관찰하는데 있어 필요한 척도로 이용되어 왔다.

이에 저자는 치성낭종 상피세포의 증식성, 분화활성도 그리고 안정성을 알아보기 위하여 치성낭종 조직 절편에서 기존에 알려져 있는 세포증식 관련인자인 PCNA, Ki-67, MPM-2와 세포분화 관련인자인 transglutaminase C, 열충격단백질 70, 그리고 apoptosis에 대한 면역조직화학적 연구를 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 표본의 채취

강릉대학교 치과병원 구강악안면외과에서 1997년 12월부터 1999년 3월까지 외과적 적출술을 통해 얻어낸 치성낭종 19례를 사용하여 파라핀 절편을 제작하였다. 치성낭종 19례 중 조직검사 상에 의해 3례는 치성 각화낭(odontogenic keratocyst, OKC)으로 판명되었고, 6례는 함치성 낭종(dentigerous cyst), 10례는 치근 낭종(radicular cyst)이었다. 또한, 제 3 대구치의 발거시 잉여의 정상 구강점막 조직 10례를 채취하여 치성 낭종과의 비교 목적으로 사용하였다.

2. 면역조직화학 염색

각 표본은 통상적으로 헤마톡실린과 에오진 염색을 한 후 낭종 상피의 세포 증식성, 세포 분화성 및 안정성을 관찰하기 위하여 면역조직화학적 염색을 시도하였다. 일차항체는 생쥐에서 얻은

Table 1. Immunohistochemical method

Deparaffinize	Xylene 10min(× 4), 99%, 90%, 75% 알콜과 증류수 처리
Blocking	3% H ₂ O ₂ 5min, PBS 30 min
Primary antibody	4°C Overnight
Secondary antibody	30min, room temperature
Streptavidin(LSAB-kit, DAKO)	30min, room temperature
DAB(diaminobenzidine)	3-5min
Counter staining	Harris hematoxylin

PCNA에 대한 단일클론성항체인 PC 10(DAKO, M0879), MPM-2(DAKO, M3514)와 토끼에서 얻은 Ki-67 항원에 대한 단일클론성항체(DAKO, N1574)와 가토에서 얻은 복합클론성항체인 열충격 단백질 70(DAKO, A500), transglutaminase C의 항체를 이용하였다. 이차항체로는 단일클론성항체로 anti-mouse와 anti-rabbit이 혼합된 이차항체 IgG를, 복합클론성항체로는 anti-rabbit IgG를 사용하여 streptavidin-peroxidase방법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다(DAKO, LSAB K0681)(Table 1).

3. ApopTag® 염색

Apoptosis의 관찰을 위해 ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kits(Intergen, S7100)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 염색을 시행하였다.

- (1) 탈파라핀 및 수화 과정을 거친후 0.5M 인산완충액으로 헹군다.
- (2) 20 μ g/ml Proteinase K(Sigma chemical Co, St. Louis, Mo)희석액으로 15°C에서 약15분간 반응시킨다. 광학현미경 100배의 시야에서 암회색으로 변색된 정도를 관찰하면서 반응시간을 조절한다.
- (3) 증류수로 헹군 후 1% 평형완충액(equilibration buffer)을 슬라이드 위에 점적후 플라스틱 덮개를 덮고 습화 용기(humidified chamber)에서 최소 10초간 반응시킨다.
- (4) 각 슬라이드당 55 μ l/5cm²씩 working strength TdT효소(반응완충액 76 μ l와 TdT효소 32 μ l 혼합액)를 37°C 습화용기에서 60분간 반응시킨다.
- (5) 미리 데워둔 working strength stop/wash buffer(1ml stop/wash buffer와 34ml 증류수의 혼합액)를 30분간 반응시킨다. 이때 10분 간격으로 흔들어 주어 슬라이드 위에 생기는 기포를 제거한다.
- (6) 0.5M 인산완충액으로 헹군후 FITC 표지된 항digoxigenin을 점적하고 플라스틱 덮개 로 덮어 차광상태에서 30분간 반응시킨다.
- (7) 0.5M 인산완충액으로 4회 세척한다.
- (8) Peroxidase 기질(75 μ l/5cm²)을 점적 후 3~6분 동안 반응시킨다.
- (9) 증류수로 1분씩 3번 세척한다.
- (10) 헤마톡실린으로 대조염색하고 고정한다.

4. 결과의 관찰

정상 구강점막 상피, 그리고 19례의 치성낭종 상피를 치성 각화낭균(OKC)과 비-치성 각화낭균(Non-OKC, 합치성 낭종과 치근 낭종)으로 분류하고, 광학현미경하에서 염증이 없는 부분을 위주로 관찰하여 면역조직화학적 염색에 대한 양성반응의 정도에 따라 네 등급으로 분류하였다. 염증이 전반적으로 나타나 염증을 완전히 배제할 수 없었던 치성낭종 상피 3례는 따로 분류하고 비교적 염증의 정도가 미약한 부분에서 동일한 관찰을 시행하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 세포증식 관련인자

19례의 치성낭종 상피세포에서 각종 증식인자에 관한 면역조직화학적 염색을 시행하여 (Table 2)와 같은 결과를 얻었다.

1) PCNA

일반적으로 정상적인 구강점막 상피(Fig. 1-A)에 비해서 치성낭종 상피에서 PCNA의 발현 정도는 다소 감소되어 있었다. 비-치성 각화낭균의 상피에서는 거의 PCNA의 양성반응이 발현되지 않는 경우가 많았으나(Fig. 1-C), 간혹 염증세포 침윤으로 인한 상피증식을 보이는 부분에서는 PCNA의 양성반응이 증가되어 있었다. 이에 비하여 치성 각화낭균의 상피에서는 PCNA의 양성반응이 증가되어 있었는데 정상적인 구강점막상피에서 보이는 것 보다는 정도는 약하지만 매우 뚜렷한 양성반응이 기저층에서 관찰되었다 (Fig. 1-B). 염증세포 침윤으로 인한 염증성 세포증식을 보이는 치성 각화낭에서는 PCNA에 강한 양성반응을 보이는 상피세포들이 낭종벽 결체조직 내로 침윤 증식하는 현상이 관찰되었다(Fig. 1-D).

2) Ki-67

일반적으로 정상적인 구강점막 상피(Fig. 2-A)에 비해서 치성낭종 상피에서 Ki-67의 발현 정도는 다소 감소되어 있었다. PCNA에 비하여 양성반응의 강도는 상당히 저하되어 관찰되었지만 PCNA에서는 양성반응이 관찰되지 않았던 비-치성 각화낭균의 상피에서도 약한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 2-C). 치성 각화낭균의 상피에서는 미만성으로 약한 양성반응이 지속적으로 관찰되었는데 (Fig. 2-B), 염증세포 침윤으로 인한 대상성 증식을 하는 상피세포에서는 Ki-67 항원성이 다소 증가되어 있었다(Fig. 2-D).

3) MPM-2

일반적으로 정상적인 구강점막 상피(Fig. 3-A)에 비해서 치성낭종 상피에서 MPM-2의 발현 정도는 다소 감소되어 있었다. 증식하는 상피세포의 핵에 미만성의 약한 양성반응이 관찰되었는데 주로 치성 각화낭균 상피의 기저층에서 이러한 양성반응이 증가되었으며 (Fig. 3-B), 비-치성 각화낭균의 상피에서는 매우 드물게 양성반응이 관찰되었으며(Fig. 3-C), 염증세포 침윤으로 인한 대상성 증식을 하는 상피세포에서는 MPM-2 항원성이 다소 증가되어 있었다(Fig. 3-D).

2. 세포분화 관련인자

19례의 치성낭종 상피세포에서 분화인자들에 관한 면역조직화학적 염색을 시행하여 (Table 3)와 같은 결과를 얻었다.

1) Transglutaminase C

치성낭종 상피에서 보이는 transglutaminase C의 발현은 정상적인 구강점막 상피(Fig. 4-A)에 비해서 감소되어 있었다. 비-치성 각화낭균의 상피에서는 매우 약하게 관찰되었으며(Fig. 4-C), 염증세포 침윤으로 인한 상피세포 증식부에서는 양성반응이 다소

Table 2. Expression of cell proliferating factors

	No inflammation								Mild inflammation								Total
	Non- OKC				OKC				Non- OKC				OKC				
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
PCNA	5	6	3				1	1		1	1					1	19
Ki-67	5	7	2			1	1			2					1		19
MPM-2	4	6	4			1	1			2					1		19

- : no + : slight ++ : moderate +++ : strong

Table 3. Expression of cell differentiating factors

	No inflammation								Mild inflammation								Total
	Non- OKC				OKC				Non- OKC				OKC				
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
TG C		7	5	2		1	1				2				1		19
HSP 70		1	5	8			1	1				2				1	19

- : no + : slight ++ : moderate +++ : strong

Table 4. Expression of apoptosis

	No inflammation								Mild inflammation								Total
	Non- OKC				OKC				Non- OKC				OKC				
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Apoptosis	11	3				2			2					1			19

- : no + : slight ++ : moderate +++ : strong

증가되어 보였다(Fig. 4-D). 이에 비해서 치성 각화낭군의 상피에서는 transglutaminase C 양성반응이 각화 상피층에 국한되어 관찰되었으며(Fig. 4-B), 염증세포 침윤으로 인하여 상피세포가 과다 증식하는 부위에서는 transglutaminase C의 발현이 증가되어 보였다.

2) 열충격단백질 70

치성낭종 상피에서 보이는 열충격단백질 70의 발현은 정상적인 구강점막 상피(Fig. 5-A)에 비해서 증가되어 있었다. 열충격단백질 70은 비교적 치성낭종 상피에서 강하게 발현되어서 비-치성 각화낭군과 치성 각화낭군의 상피에서 모두 강한 양성반응을 보였다(Fig. 5-B, C). 비-치성 각화낭군에서 상피층이 5~7 세포층으로 얇은 경우에는 전체 세포층에서 강한 양성반응을 보였으며, 점차 세포층이 두꺼워져서 10~20층의 두터운 세포층을 보이는 경우에는 superficial layer쪽에 편재되어 강한 양성반응을 보였다. 치성 각화낭군의 상피에서는 일반적으로 전 세포층에 고르게 양성반응을 보였는데 그 중에서 각화 세포층에 보다 강한 양성반응을 보였다. 한편 염증세포 침윤으로 인한 상피세포 증식을 보이는 부분에서는 열충격단백질 70에 매우 강한 양성반응을 보였는데(Fig. 5-D), 이러한 양성반응이 대식세포 등에서도 관찰되었다.

3. Apoptosis

19례의 치성낭종 상피세포에서 ApopTag[®] 염색을 시행하여(Table 4)와 같은 결과를 얻었다.

치성낭종 상피는 정상 구강점막에 비하여 ApopTag[®] 염색에 양성반응이 매우 감소되어 있었다. 비-치성 각화낭군의 상피에서는 ApopTag[®] 염색이 거의 관찰되지 않았으며, 치성 각화낭군의 상피에서 표재성으로 드물게 양성반응을 보였으며(Fig. 6-A, B), 특히 낭종내부로 탈락되어가는 상피세포들이 ApopTag[®] 염색에 양성반응을 보였다(Fig. 6-C).

IV. 총괄 및 고찰

치성낭종 상피세포는 일반 구강점막 상피세포와는 다른 상피 분화과정을 거치며 구강 점막 상피에 비교해서 세포의 활성화도에 대한 논란이 계속되어 왔다^{22,32,33}. 이는 치성낭종 상피의 지속적인 증식이 치계종양으로 발전하게 되므로 구강점막 상피에 비하여 매우 증식성이 높은 상피 세포군으로 간주되기도 한다. 그러나 한편으로는 치성낭종이 발생하는 범랑상피 잔사는 증식성이 약

한 동면상태의 상피 잔사로서 구강점막 상피에 비하여 활성화도가 매우 낮을 것으로 추측된다. 상피내부가 낭종성 변성을 통하여 높은 삼투압에 견디기 위해서는 구강점막 상피와는 다르게 망상 돌출을 형성하지 못하고 단순히 인근 낭종벽의 적은 양만의 혈관으로부터 영양공급과 대사과정을 유지하여야 한다^{16,17}. 따라서 치성낭종 상피의 세포활성도가 구강점막 상피보다는 낮은 것으로 생각된다^{20,21}. PCNA는 DNA 중합효소 δ 의 보조인자(cofactor)로서 DNA 중합효소의 활성을 촉진시켜 DNA 복제를 증가시키는 작용을 함으로 세포분열의 강한 표지자로 여겨지고 있다. 이 PCNA는 1978년 Miyachi 등이 홍반성 낭창 환자의 혈청에 항체가 존재함을 밝힌 이후 알려졌고³⁰, Bravo 등은 PCNA가 36kDa의 핵 단백질로서 G1 후기에서 S기 초기 세포의 특징적인 표지자가 될 수 있다고 하였다^{35,36}. 즉 PCNA 항원성은 세포주기의 G1 후기부터 S기의 전반에 걸쳐 발현됨으로 이 단백질에 대한 항체는 증식 세포의 핵을 면역화학적으로 검출하는데 매우 유용한 도구로 사용될 수 있다. 따라서 조직 내에서 관찰하고자 하는 세포군의 증식성을 쉽게 관찰할 수 있으며, 비교적 항원성이 뚜렷해서 포르말린 고정 처리된 표본에서도 식별이 가능하다³⁷.

또한 활발히 분열, 증식하는 세포들은 여러 가지 특이한 단백질들을 생성하는데 이들 단백질들은 세포주기 분석에 유용한 지표로 이용될 수 있다. Ki-67 단일클론성 항체는 이러한 단백질들 중 휴지기의 세포에는 존재하지 않고 증식중인 세포에만 존재하는 증식과 연관된 핵항원을 인지하는 것으로 알려져 있다. 즉 Ki-67 항체는 DNA 전구물질을 사용하지 않고 성장분획을 신속히 파악할 수 있으므로 실용적이다. Ki-67 단일클론성 항체는 원래 Reed-Sternberg 세포에 대해 만들어진 항체로서, 분자량이 345kDa 또는 395kDa인 두 개의 폴리펩티드 사슬로 이루어진 non-histone 핵 단백질로서 10번 염색체에 위치한 유전자에 의해 그 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. Ki-67 단일클론성 항체는 G0기를 제외한 G1, S, M, 그리고 G2기의 증식하는 세포에서 양성 반응을 보이지만^{38,40}, 이 단백질의 구조화에 따라서 항원성이 매우 감소되므로 주로 신선한 동결조직 표본에서 사용되어 왔다. 그러나 1992년 Cattoretti 등이 Ki-67 항원의 일부 재조합 부위에 대한 단일클론성 항체인 MIB 항체를 사용함으로써 파라핀으로 포매된 조직에서도 Ki-67 항원에 대하여 동일한 반응을 할 수 있게 되었다. 따라서 저장되어 있는 오래된 파라핀 포매 조직으로도 면역화학적 염색이 가능해지고 세포분열의 활성화도에 대한 후향성 연구도 가능하게 되었다⁴¹. 본 연구에서도 신선조직절편이 아닌 파라핀 포매 조직을 이용하여 치성낭종 상피세포의 증식성을 확인하였다.

유사분열하는 HeLa 세포의 추출물을 면역원(immunogen)으로

사용하여 mitotic protein에 특이성을 갖는 13종의 단일클론성 항체가 얻어졌고 MPM-1에서부터 MPM-13으로 명명되었다^{38,42}. 이 중에서도 MPM-1과 MPM-2가 가장 잘 알려져 있으며, MPM-2는 유사분열하는 세포에서 풍부하게 나타나며 분자량 55-210kDa의 큰 범위를 갖는 일련의 인단백(phosphoprotein)들을 인지한다. 이러한 일련의 인단백들은 세포분열의 중간기(interphase)에 합성되고 G2/M 전환기 동안에 인산화되어 MPM-2와 반응한다^{38,42}. 이상 세 개의 PCNA, Ki-67, mitotic protein은 증식하는 세포에서 특징적으로 발현되는 단백질이므로 치성낭종 상피에서 이 세 단백질에 대한 항원성 검사는 치성낭종 상피의 활성도를 파악할 수 있으리라 판단된다.

본 연구에서는 상피세포의 활성도를 측정하기 위한 다양한 종류의 항체를 이용하여 치성낭종 상피의 증식성, 세포 분화성 및 세포 안정성에 관한 관찰을 수행하였다. 치성낭종 상피의 증식성은 PCNA, Ki-67에 대한 항체와 MPM-2 항체를 이용하여 관찰한 결과 정상 구강점막에 비하여 다소 낮은 세포 증식성을 보였다. 치성낭종 상피의 증식성은 비-치성 각화낭군의 상피보다는 치성 각화낭군의 상피에서 훨씬 증가되어 있었으며, 염증세포 침윤으로 인한 대상성 상피증식 부위에서는 세포 증식이 매우 증가되어 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통하여 일반적으로 치성낭종 상피의 증식성이 정상 구강점막 상피의 증식성보다는 감소되어져 있었으나 염증상태나 기타의 세포자극에 의해서 매우 심한 증식 상태로 전환되어질 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.

Transglutaminase는 펩티드 결합성 글루타민 잔기의 γ -carboxamide기가 acyl기 공급체로 작용하는 칼슘 의존성 아실 전이 반응을 촉매하여 분자들 간의 isopeptide 결합을 형성하는 일련의 효소들의 총칭이다. Transglutaminase와, acyl기의 수용체 역할을 하는 펩티드 결합성 라이신(lysine)과의 결합은 생물학적으로 생체내의 다양한 생리, 생화학적 반응의 기저를 이루고 있다. 즉 transglutaminase의 생물학적 의의는 동효소에 의한 교결합이 세포 내에서 만들어진 각종 단백질을 구조화시키거나 활성화시켜 여러 조직의 구조적 안정화에 기여함에서 찾을 수 있다²⁷. 특히 조직성 transglutaminase는 세포 증식과 세포분화에 깊이 관여하는 것으로 여겨진다. Transglutaminase는 체액뿐 아니라 세포 내외에서 유리된 형태 또는 세포막에 결합된 형태로서 다양하게 규명되어 왔다. 일례로 transglutaminase C는 단단위성 단백질로서 아미노산 서열분석을 통한 분자량의 계산으로 76.6kDa의 분자량을 가지고 있으며 세포내외에서의 기능에 대해서는 명확히 규명되지 않았으며, transglutaminase E는 표피세포 분화 과정 마지막 단계에서 각화된 보호막을 형성하는데 기여하는 것으로 알려져 있다^{27,43-45}.

본 연구에서 치성낭종 상피의 세포학적 분화도를 간접적으로 측정하기 위하여 transglutaminase C 효소에 대한 항체를 면역조직화학적 염색을 통해 관찰하였는데 transglutaminase C 항체의 염색반응은 정상 구강점막 상피에 비해서 치성낭종 상피에서는 매우 낮은 양성반응을 보이므로, 치성낭종 상피의 세포분화가 정상 구강 점막상피의 세포분화보다 현저하게 저조한 것을 나타

낸다. 치성낭종 상피의 세포층이 잘 분화되어 있지 않지만 transglutaminase C 항원 염색에서 잘 구별되는 각화 상피층을 관찰하였는데 이는 치성낭종 상피에서도 정상 구강 점막상피와 마찬가지로 일정한 세포분화 과정을 이루고 있음을 간접적으로 나타낸다.

스트레스 단백질로도 불리우는 열충격단백질은 1962년 Ritossa가 *Drosophila*에 고온을 적용하면 염색체의 puffing이 일어나는 현상을 관찰한 이후 연구된 특수단백질이다. 온도상승 이외에도 DNA 바이러스 감염, 비소와 같은 중금속에 의한 에너지 대사의 억제, 산소 유리 라디칼, adriamycin과 같은 독성 화학물질에의 노출, 그리고 interleukin, tumor necrosis factor와 같은 사이토카인 등에 의해 그 발현이 증가되는 열충격단백질은 스트레스에 의한 세포내 단백질의 변성을 막아주어 손상된 단백질을 안정화 시켜주는 물질로 알려져 있다. 열충격에 의하여 유도되는 유전자들로부터 생산되는 단백질의 분자량과 아미노산 서열의 유사성에 따라 분자량 15~32kDa의 작은 열충격단백질, 60kDa, 70kDa, 90kDa과 100kDa 열충격단백질로 나뉘어진다. 그 중 분자량 70~80kDa 사이의 열충격단백질이 가장 많은 양을 차지하며 열충격단백질 70으로 불린다^{26,46}. 세포가 열충격을 받게되면 그 강도에 따라 정상적인 단백질의 합성이 감소하여 일정 온도 이상이 되면 열충격단백질의 합성을 제외하고는 거의 모든 단백질의 합성이 중지된다. 이것은 세포의 자기보호 기전이라 생각되는데, 높은 온도에서는 단백질의 적절하고 올바른 folding이 이루어질 수 없으므로 이러한 상태에서 발현시킨 단백질은 그 활성이 제대로 나타날 수 없기 때문이며, 열충격에 대항하기 위해 만들어 내야 하는 열충격단백질을 충분히 만들어 내기 위해 다른 단백질의 발현은 억제되는 것으로 여겨진다. 열충격단백질 70은 열충격에 의해 발현되는 단백질 중 가장 많은 부분을 차지하는 단백질로서 thermotolerance와 가장 연관성이 큰 열충격단백질이다. 즉 열충격단백질 70은 세포내에서 단백질의 변성을 방지하거나 변성된 단백을 재생하는 역할을 하며, 특히 각종 악성종양에서의 작용과 세포증식 및 분화에서의 역할이 연구되고 있다⁴⁷⁻⁵⁰.

본 연구에서 열충격단백 70 항체에 양성반응은 정상 구강점막 상피에서보다 치성낭종 상피에서 강하게 관찰되었는데 치성 각화낭군에서 뿐만 아니라 비-치성 각화낭군에서도 고르게 양성반응이 관찰되었다. 이는 낭종상피가 전반적으로 외부의 스트레스에 강하게 노출되어 있는 것을 의미한다. 또한 염증세포 침윤으로 인해 대상성 상피증식을 보이는 부분에서도 매우 증가된 양성반응이 관찰되었는데 이는 염증과 연관된 산화성 손상, 종양괴사인자(tumor necrosis factor)와 같은 염증성 사이토카인에 대한 낭종상피의 반응의 결과로 생각된다. 따라서 치성낭종 상피는 낭종성 자극에 의해서 열충격단백질 70에 의한 양성반응은 증가되어 보였고, transglutaminase C에 의한 세포 분화정도는 감소되어 있으므로 일반적으로 치성낭종 상피는 정상 구강상피에 비하여 매우 불안정한 상태라고 생각할 수 있다.

각 세포들은 그들이 더 이상 필요하지 않거나 심한 자극을 제거할 목적으로 자신의 세포를 내인성으로 파괴시키는 과정을 실행시킬 수 있다. 이와 같은 예정된 세포사는 유전자에 프로그램

되어 있으며, 이의 발현은 세포의 특징적인 형태학적 및 생화학적 변화를 수반하며 이러한 예정된 세포사의 현상을 apoptosis라고 부른다^{28,29}. Apoptosis의 발현은 정상이나 비정상적인 과정에서 조직의 형태와 모양을 조절하는 역할을 하고 세포의 분화와 세포사간의 평형을 유지함으로써 조직의 지속적인 재생과 항상성을 유지하게 된다³¹. Apoptosis가 일어나는 동안에는 세포의 또 다른 사망형태인 necrosis와는 달리 핵과 세포질은 농축(condensation)되고 분절(fragmentation)되며 막에 둘러싸인 apoptotic body를 형성하게 된다. 결국 이러한 세포는 인접세포나 포식세포에 의하여 포식된다^{32,33}. 본 연구에서 시행한 ApopTag[®] 염색법은 분절된 핵을 감지하는 염색법으로서 TUNEL 분석법과는 달리 약물에 의해 유도된 DNA 손상도 확인할 수 있으며, DNA 이중나선의 분절현상이 많지 않은 조기 apoptosis상태도 감지할 수 있는 장점이 있다. 생화학적으로는 chromatin이 분해되어 50-300 kilobase로 잘려나간 후, 다시 200 base 정도의 monomer나 oligomer로 잘려나가는 과정을 겪는다. 이와 같이 apoptosis는 형태학적, 생화학적 변화가 수반되는 활동적인 생물학적 과정으로 세포나 조직에 따라 차이가 있을 수 있으며, apoptosis에 문제가 생기면 암화가 발생하거나 면역체계의 기능이 저하되게 된다.

치아의 형성과 동시에 apoptosis에 의해 소멸됐어야 할 잔존 범랑상피와 Malassez 상피잔사 등에서 유래한 치성낭종 상피의 apoptosis에 대한 본 연구 결과, 정상 상피에서 보이는 최종 분화 과정에 나타나는 apoptosis 현상이 치성낭종 상피에서 매우 드물게 관찰된 것으로 보아 치성낭종 상피는 최종 분화(terminal differentiation)에 장애를 받고 있음을 알 수 있다. 특히 비-치성 각화낭군의 상피에서는 apoptosis가 전혀 관찰되지 않았는데 비하여, 치성 각화낭군의 상피에서는 부분적으로 탈락되어지는 상피세포에서 양성반응이 관찰되었다. 이는 비-치성 각화낭군의 상피에 비하여 치성 각화낭군의 상피는 일정한 두께의 상피층을 이루면서 지속적인 상피탈락을 진행할 수 있으므로 낭종 내부의 삼투압을 점진적으로 증가시키게 되어 지속적인 낭종화가 이루어져서 더 빠른 속도로 낭종이 팽창된다고 볼 수 있다.

이와 같이 치성낭종 상피에서 관찰한 상피세포의 증식성, 분화성 그리고 apoptosis를 비교한 결과 비염증성 치성낭종 상피는 정상적인 구강 점막상피에 비하여 세포 증식성, 세포 분화성 그리고 apoptosis의 활성도가 감소되어져 있으나, 치성낭종에 염증성 자극이 지속적인 만성 염증으로 이행됨으로써 치성낭종 상피의 염증성 변성으로 상피증식을 보이는 치성낭종에서는 정상적인 구강상피의 세포증식보다 훨씬 증가되어 있는 것을 관찰하였다. 따라서 치성낭종 상피가 여러 가지 원인에 의해 염증성 증식을 하는 경우에는 유전분(amyloid) 물질의 생성, 석회화, 종양 등과 같은 비특이성 변화를 일으킬 가능성이 높을 것으로 생각된다.

V. 결 론

강릉대학교 치과병원 구강악안면외과에서 외과적 적출을 통해 얻어낸 치성낭종 19례와 정상 구강점막 10례를 이용하여 낭종 상피세포의 증식성, 세포 분화성 및 apoptosis를 관찰하기 위

하여 면역조직화학적 염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 치성낭종 상피의 증식성은 PCNA, Ki-67, MPM-2 등의 항체를 이용하여 관찰한 결과 정상 구강점막에 비하여 다소 낮게 관찰되었으며, 비-치성 각화낭군의 상피보다는 치성 각화낭군의 상피에서 훨씬 증가되어 있었다.
- 2) 치성낭종 상피의 분화성은 transglutaminase C를 이용한 항원성을 관찰한 결과 일반적으로 정상 구강 점막상피에 비하여 낮은 양성 반응을 보였고, 치성 각화낭군의 상피에서는 각화층에 국한되어 강한 양성 반응을 보였다. 또한 열충격단백질 70은 모든 치성낭종에서 강한 양성반응을 보였다.
- 3) 세포능동사망현상은 비-치성 각화낭군의 상피에서 관찰되지 않았고, 치성 각화낭군 상피의 부분적으로 탈락되는 상피세포에서 양성반응이 관찰되었다.
- 4) 특히 염증성 증식을 보이는 낭종상피에서는 세포증식인자가 전 세포층에서 미만성 양성발현이 관찰되었다.

이상의 결과에서 치성낭종 상피세포는 정상 구강점막 상피에서보다 세포 증식과 분화인자의 발현이 다소 저조한 것으로 나타났다. 낭종상피의 활성도는 낭종 내부의 염증세포 침윤이나 간염조직에서 발생하는 자극에 의하여 크게 영향을 받을 것으로 추론되었다.

참 고 문 헌

1. 김경옥, 이재훈: 악골에 발생한 낭종의 임상적 연구. 대한악안면성형체재외과학회지 21:166, 1999.
2. 정성훈, 이의웅: 악골에 발생한 양성 치성종양의 임상 및 병리조직학적 연구. 대한구강악안면외과학회지 17:83, 1991.
3. Browne RM: The pathogenesis of odontogenic cysts: a review. J Oral Pathol 4:31, 1975.
4. 한지훈, 박형식: 악골에 발생한 낭종의 임상 및 병리조직학적 연구. 대한구강악안면외과학회지 19:22, 1993.
5. Chindia ML: Pathogenesis of odontogenic cysts. East Afr Med J 68:276, 1991.
6. Harris M, Toller P: Pathogenesis of dental cysts. Br Med Bull 31:159, 1975.
7. Scharffetter K, Balz-Herrmann C, Lagrange W, Koberg W, Mittermayer C: Proliferation kinetics-study of the growth of keratocysts. Morpho-functional explanation for recurrences. J Craniomaxillofac Surg 17: 226, 1989.
8. Torabinejad M: The role of immunological reactions in apical cyst formation and the fate of epithelial cells after root canal therapy: a theory. Int J Oral Surg 12:14, 1983.
9. Meghji S, Harvey W, Harris M: Interleukin 1-like activity in cystic lesions of the jaw. Br J Oral Maxillofac Surg 27:1, 1989.
10. Meghji S, Henderson B, Bando Y, Harris M: Interleukin-1: the principal osteolytic cytokine produced by keratocysts. Arch Oral Biol 37:935, 1992.
11. Meghji S, Qureshi W, Henderson B, Harris M: The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. Arch Oral Biol 41:523, 1996.
12. Gao Z, Flaitz CM, Mackenzie IC: Expression of keratinocyte growth factor in periapical lesions. J Dent Res 75: 1658, 1996.
13. Gao Z, Mackenzie IC, Rittman BR, Korszun AK, Williams DM, Cruchley AT: Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. J Oral Pathol 17: 84, 1988.
14. Gao Z, Mackenzie IC, Williams DM, Cruchley AT, Leigh I, Lane EB:

- Patterns of keratin-expression in rests of Malassez and periapical lesions. *J Oral Pathol* 17:178, 1988.
15. Anand VK, Arrowood JP, Krolls SO: Odontogenic keratocysts: a study of 50 patients. *Laryngoscope* 105:14, 1995.
 16. Dubiel-Bigaj M: Odontogenic cysts--histogenesis, histology, potential for possible neoplastic transformation (editorial). *Patol Pol* 44:45, 1993.
 17. Kakarantza-Angelopoulou E, Nicolatou O: Odontogenic keratocysts: clinicopathologic study of 87 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 48:593, 1990.
 18. 박영욱, 김지혁, 이석근: 사람의 매복치 치배낭에 잔존된 법랑상피의 종양성 변화를 탐지하기 위한 면역조직화학적 연구. *대한구강악안면외과학회지* 25:216, 1999.
 19. Davis FM, et al: Monoclonal antibodies to mitotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2926, 1983.
 20. Li TJ, Browne RM, Matthews JB: Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki-67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. *J Oral Pathol Med* 24:221, 1995.
 21. Li TJ, Browne RM, Matthews JB: Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. *J Oral Pathol Med* 1994; 23:184-189
 22. Lin LM, Wang SL, Wu-Wang C, Chang KM, Leung C: Detection of epidermal growth factor receptor in inflammatory periapical lesions. *Int Endod J* 29:179, 1996.
 23. Murtadi A, Grehan D, Toner M, McCartan BE: Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 81:217, 1996.
 24. Slootweg PJ: p53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 24:393, 1995.
 25. 최규환, 이동근: 헬스터 구강암 발생 과정에서 Heat shock protein에 관한 면역조직화학적 연구. *대한악안면성형재건외과학회지* 20:362, 1998.
 26. Lindquist SC: The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151, 1986
 27. Lee SK, Chi JG, Jeon YJ, et al: Expression of Transglutaminase C during the prenatal development of human major salivary glands. *J Dent Res* 74:1812, 1995.
 28. Alison MR, Sarraf CE: Apoptosis: a gene-directed program of cell death. *JR Coll. Physicians Lond* 26:25, 1992.
 29. Arends MJ, Wyllie AH: Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32:223, 1991.
 30. Park JY, Lee CH: Apoptosis in the epithelium of odontogenic keratocyst. *The Korean Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 23(2):91-98, 1999.
 31. Willie AH, Beattie GJ, Hargreaves AD: Cell death; the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-356, 1980.
 32. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, et al.: Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Dent Res* 78: 1345, 1999.
 33. Mason GI, Matthews JB: In situ determination of different dehydrogenase activity profiles in the linings of odontogenic keratocysts and radicular cysts. *Histochem J* 28: 187, 1996.
 34. Miyachi K, Frizler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear in proliferating cell. *J Immunol* 121:2228, 1978.
 35. Bravo R, Frank R, Blundell Pa, Mac Donald-Bravo H: Cyclin/PCNA is auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* 326:515, 1978.
 36. Bravo R: Synthesis of the nuclear protein cyclin and it's relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 163:2987, 1986.
 37. Galand P, Degraef C: Cyclin/PCNA immunosteinings an alternative tritiated thymidine plus labelling for marking S-phase in paraffin section from animal and human tissue. *Cell tissue kinet* 22:383, 1989.
 38. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1331:1710, 1984.
 39. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al: Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138:867, 1991.
 40. Schonk DM, Kuijpers HJH, van Drunen E, et al: Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet* 83:297, 1989.
 41. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen(MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *Journal of Pathology* 168:357, 1992.
 42. Kuang J, et al: A novel M phase-specific H1 kinase recognized by the mitosis -specific monoclonal antibody MPM-2. *Dev Biol* 144:54, 1991.
 43. Kim HC, Idler WW, Kim IG, et al : The complete aminoacid sequence of human transglutaminase K enzyme deduced from the nucleic acid sequence of cDNA clones. *J Biol Chem* 266:536, 1991.
 44. Kim HC, Lewis MS, Gorman JJ, et al : Protransglutaminase E from guinea pig skin-isolation and partial characterization. *J Biol Chem* 265:21971, 1990.
 45. Park SC, Kim SY, Kim HC, Song KY: Differential expression of transglutaminases in human foreskin and cultured keratinocyte. *J Cell Biol* 197:139, 1989.
 46. Wong HR, Jonathan RW: The stress response and the lung. *Am J Physiol* 273:1, 1997.
 47. Minowada G, Welch W: Variation in the expression and/or phosphorylation of the human molecular weight stress protein during in vitro cell differentiation. *J Biol Chem* 270:7047, 1995.
 48. Mivechi NF, Park YMK, Ouyang H, Shi XY, Hahn GM: Selective expression of heat shock genes during differentiation of human myeloid leukemic cells, *Leuk Res* 18:597, 1994.
 49. Richards FM, Watson A, Hickman JA: Investigation of the effects of heat shock and agents which induce a heat shock response on the induction of differentiation of HL-60 cells, *Can Res* 48:6715, 1988.
 50. Kwak HJ, Jun CD, Pae HO, Yoo JC, Choi BM, Na YG, Park RK, Chung HT, Chung HY, Park WY, Seo JS: The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation, and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells, *Cell Immu* 187:1, 1998.
 51. Willians GT: Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65:1097, 1991.
 52. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493, 1992.
 53. Wyllie AH, Beattie GJ, Hargreaves AD: Cell death; the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251, 1980.

사진부도 설명

Fig. 1. Immunostaining of PCNA (Hematoxylin counter staining)

- A. Normal oral mucosa ; frequently positive in basal and parabasal epithelial cells (arrow)($\times 200$)
- B. OKC ; keratinized cyst epithelium showed frequent positive reaction (arrow)($\times 200$)
- C. Non-OKC ; cyst epithelium without inflammatory cell infiltration showed rare positive reaction($\times 400$)
- D. Mild inflammation ; the PCNA positive reaction was very strong in the nuclei (arrow)($\times 1,000$)

Fig. 2. Immunostaining of Ki-67 (Hematoxylin counter staining)

- A. Normal oral mucosa ; intensely positive reaction in basal epithelial cells (arrow) ($\times 400$)
- B. OKC ; showed diffuse positive reaction in the basal layer cells (arrows)($\times 1,000$)
- C. Non-OKC ; weak positive reaction in the cyst epithelium (arrow)($\times 400$)
- D. Mild inflammation ; When the inflammatory hyperplasia of cyst epithelium occurred, the positive reaction increased(arrow)($\times 400$)

Fig. 3. Immunostaining of MPM-2(Hematoxylin counter staining)

- A. Normal oral mucosa ; weakly positive in normal oral mucosal epithelium($\times 200$)
- B. OKC ; showed diffuse positive reaction in the basal layer cells(arrows)($\times 1,000$)
- C. Non-OKC ; cyst epithelium showed slight positive reaction of MPM-2 (arrow) ($\times 400$)
- D. Mild inflammation ; Inflammatory hyperplasia of cyst epithelium induce the diffuse positive reaction(arrow)($\times 400$)

Fig. 4. Immunostaining of transglutaminase C (Hematoxylin counter staining)

- A. Normal oral mucosa ; intensely positive in epithelium(arrow)($\times 200$)
- B. OKC ; thick keratinized epithelium also showed diffuse positive reaction through the whole cell layer($\times 200$)
- C. Non-OKC ; showed only weak positive reaction(arrow)($\times 200$)
- D. Mild inflammation ; some portion of inflammatory hyperplastic epithelium of cyst also showed intense positive reaction(arrow)($\times 400$)

Fig. 5. Immunostaining of HSP70 (Hematoxylin counter staining)

- A. Normal oral mucosa ; moderately positive in normal oral mucosal epithelium(arrow)($\times 200$)
- B. OKC ; a portion(arrow) of early keratinization of cyst epithelium revealed the strong reaction($\times 1,000$)
- C. Non-OKC ; thin epithelium of cyst also showed intense staining of HSP70(arrow)($\times 400$)
- D. Mild inflammation ; Intense positive reaction was observed in a portion of hyperplastic cyst epithelium($\times 1,000$)

Fig. 6. Apoptag staining for apoptosis (Hematoxylin counter staining)

- A. Superficial keratocytes of OKC were positive(arrow)($\times 200$)
- B. High magnification of A, some nuclei(arrow) were intensely stained($\times 1,000$)
- C. Exfoliated cornified cells were weakly positive(arrow)($\times 1,000$)
- D. Negative control for the immunohistochemistry and ApopTag staining by using rabbit serum instead of primary antibody($\times 200$)

사진부도 ①

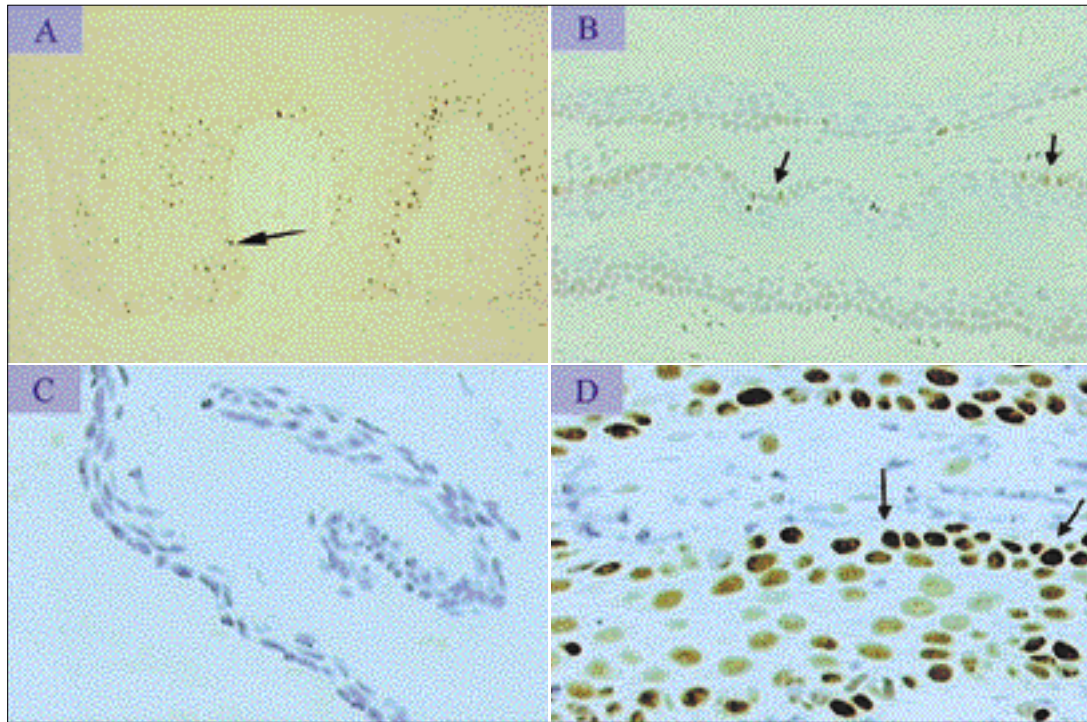


Fig. 1

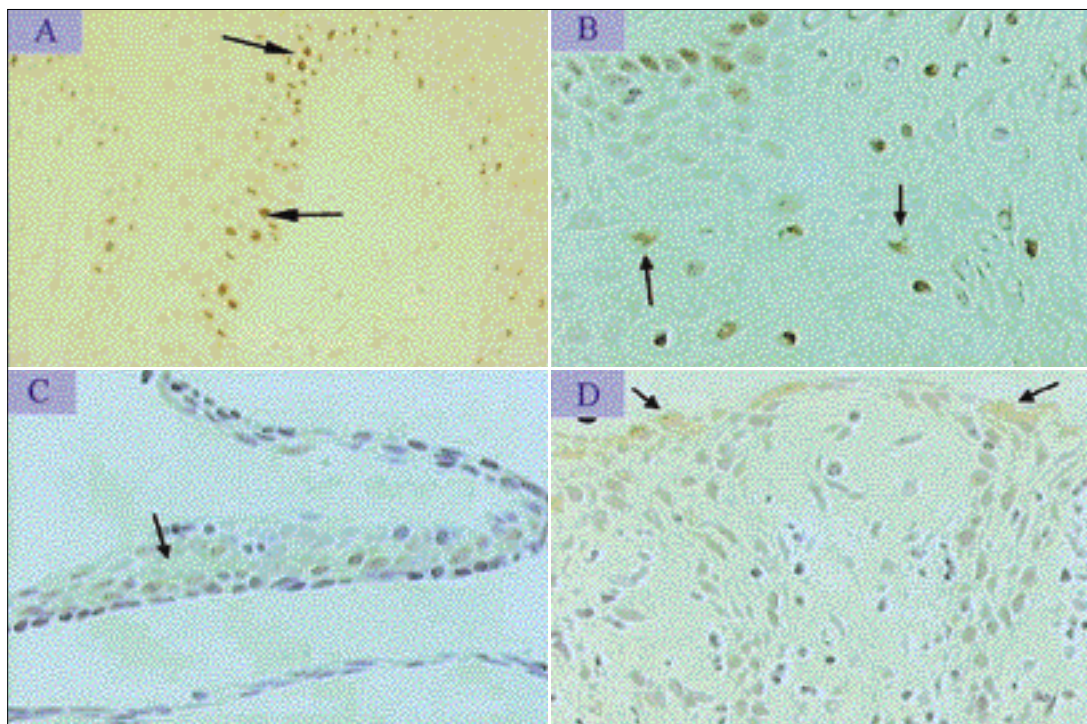


Fig. 2

사진부도 ②

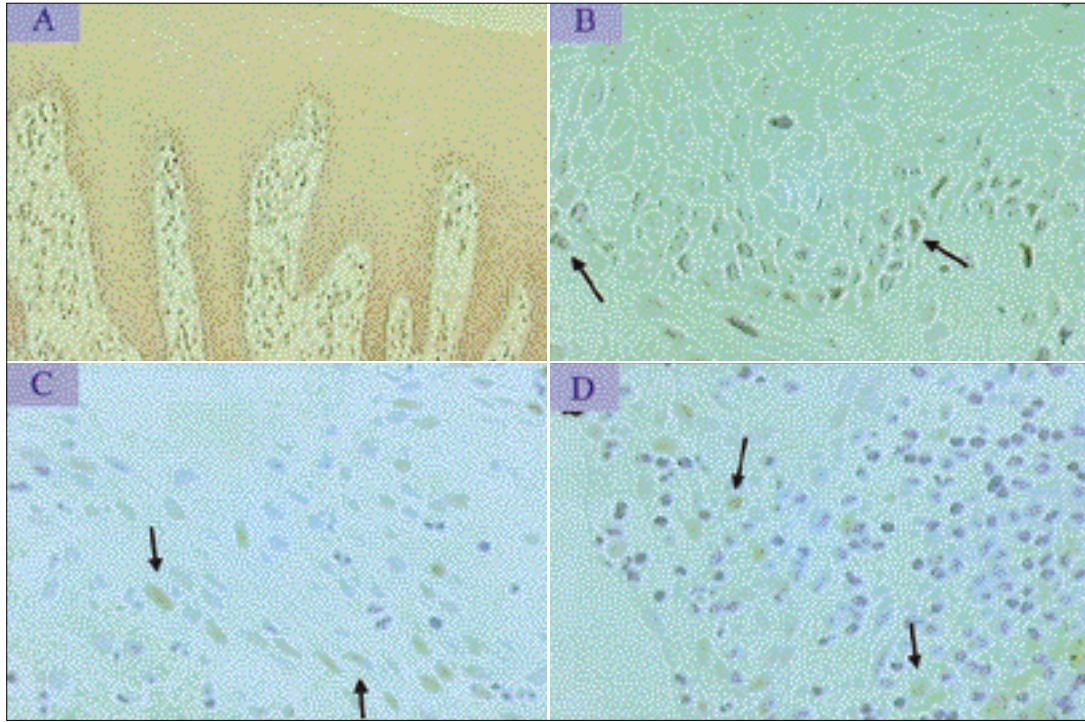


Fig. 3

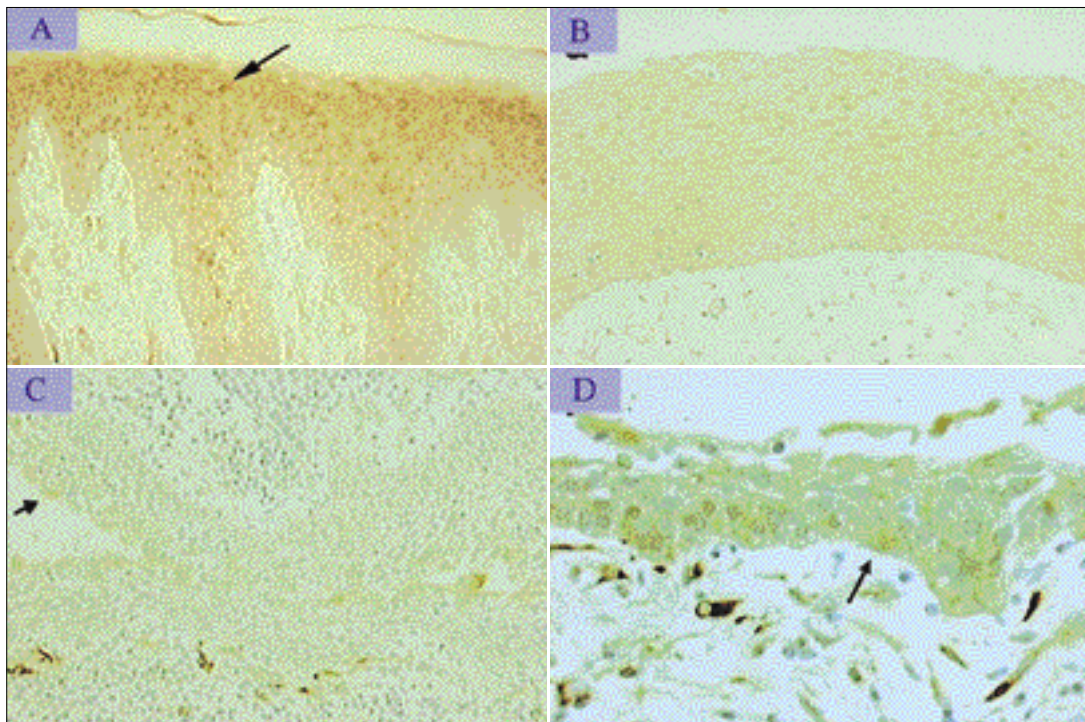


Fig. 4

사진부도 ③

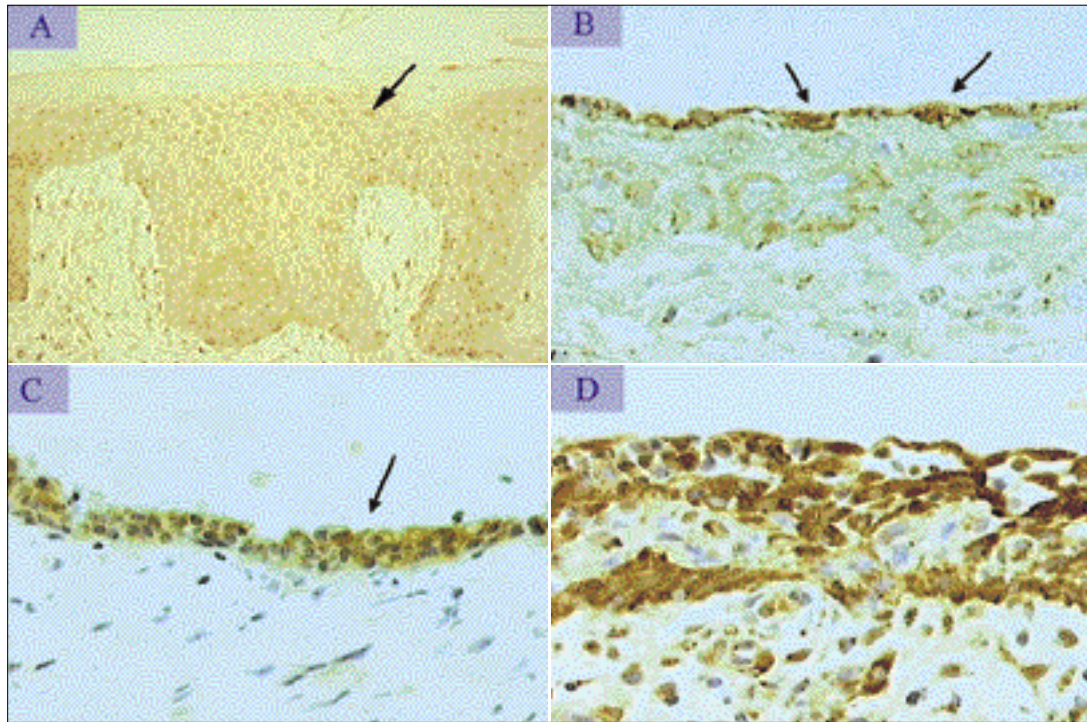


Fig. 5

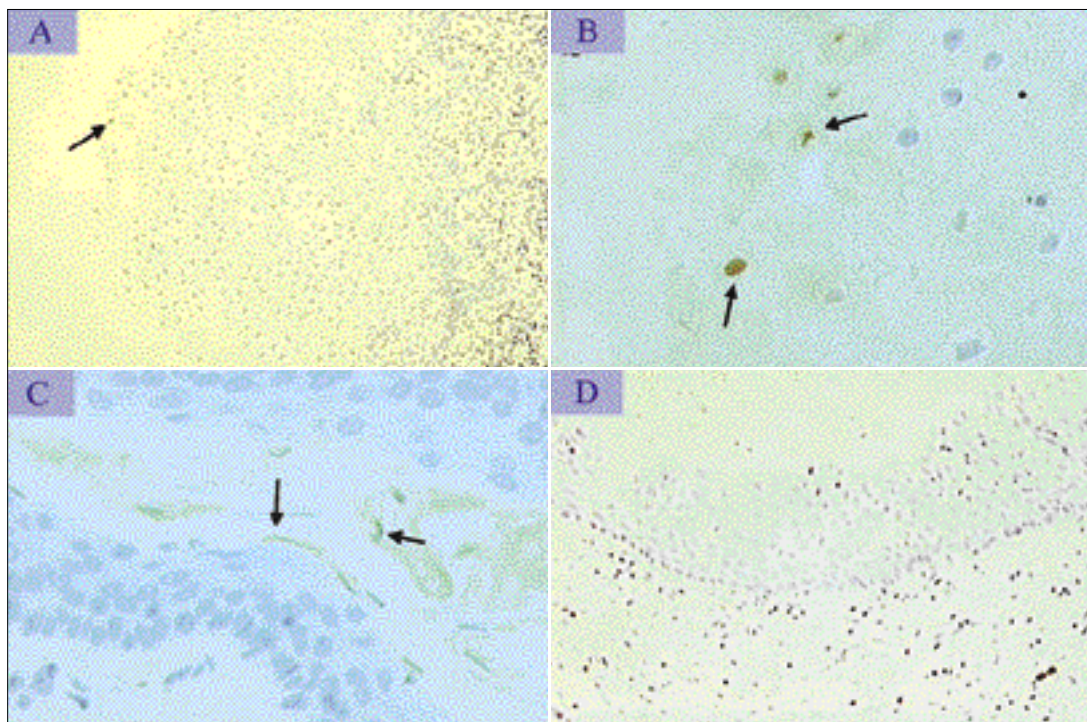


Fig. 6