

흰쥐 태아 구개융합부위 상피세포의 아포프토시스에 관한 연구

이 홍 주¹⁾ · 차 경 석²⁾ · 이 진 우³⁾

악안면 부위에서 가장 빈번히 발생하는 선천적 기형의 하나인 구개열은 그 원인요소가 명확히 밝혀져 있지 않지만 구개발생 과정 중 어느 한 단계에서의 이상으로 발생하며 양측 구개판의 융합 후 융합상피의 제거가 이루어지지 않는 것도 그 원인의 하나로 알려져 있다.

본 연구는 구개발생시 구개판 융합상피의 제거가 아포프토시스에 의한 것임을 확인하고 아포프토시스가 일어나는 시기와 위치를 규명하기 위해 시행되었다. 체중 200gm 내외의 암컷흰쥐 12마리를 체중 250gm 내외의 수컷흰쥐와 교배시켜 16.0일, 16.5일, 16.75일, 17.0일 태아를 얻었으며 각 태아에서 두부만을 파라핀 포매하여 전두절단 하였다. 조직 절편에서 형태학적 소견을 관찰하기 위한 H-E 염색과 아포프토시스를 인지하기 위한 TdT 염색을 시행한 후 광학현미경을 통해 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 16.0일과 16.5일 된 태아의 표본에서 접촉전의 양측 구개판의 내측단 상피에서는 아포프토시스를 관찰할 수 없었으며, 구개판의 접촉 직후 상피세포간의 융합이 이루어지는 부위에서는 극히 소수의 아포프토시스 세포들만이 관찰되었다.
2. 16.75일 된 태아의 표본에서 연속성을 거의 잃지 않은 정중 상피융합에서는 아포프토시스를 거의 관찰할 수 없었으나, 비강측과 구강측의 상피삼각 그리고 비중격과 구개판이 접촉하는 부위, 특히 비중격의 외측연과 접촉하는 부위에서는 다수의 아포프토시스 세포들이 관찰되었다.
3. 16.75일 된 태아의 표본에서 정중 상피융합이 연속성을 잃고 상피섬들로 나뉘어지는 시기에서는 상피섬과 상피삼각 부위에서 증가된 아포프토시스 세포들을 관찰할 수 있었으며 근접한 구강, 비강상피에서도 다수의 아포프토시스 세포들이 관찰되었다.
4. 17.0일 된 태아의 표본에서 상피섬이 많이 소실되어 간엽조직에 의한 융합이 이루어지고 있는 부위에서는 아포프토시스 세포들이 거의 관찰되지 않았으나 상피삼각부위와 구강, 비강상피에서는 아직도 다수의 아포프토시스 세포들이 관찰되었다.

이상의 결과로 흰쥐 태아의 구개발생시 구개융합부위의 상피세포가 아포프토시스에 의해 제거된다는 사실을 알 수 있었으며 이러한 아포프토시스에 의한 융합상피세포의 제거는 주로 구개융합의 후반기에 상피섬과 상피삼각 부위에서 일어난다는 사실을 알 수 있었다.

(주요단어 : 구개융합, 아포프토시스, TdT염색)

¹⁾ 단국대학교 치과대학 교정학교실 석사.
²⁾ 단국대학교 치과대학 교정학교실 교수.
³⁾ 단국대학교 치과대학 교정학교실 조교수.

교신저자 : 이홍주
충남 천안시 신부동 산 7-1
042-550-1941/2 / 011-259-0742
orthamonics@hanmail.net

I. 서 론

안면에 발생하는 선천성 기형중의 하나인 구개열(cleft palate)의 원인은 유전인자와 환경인자들간의 상호작용에 의한 복합적 요인에 의한 결합으로 알려져 있을 뿐 그 원인 요소가 명확히 밝혀져 있지 않다.

포유류에서 2차 구개의 형성은 복잡하고 다양한 일련의 발생과정을 통해 이루어지며, 형태학적인 발생과정은 크게 4단계로 나눌 수 있다. 첫 번째 단계는 상악돌기(maxillary process)의 내하방에서 구개판(palatal shelf)의 발생이며 이 구개판은 초기에는 혀의 외측에서 수직방향으로 성장하게 된다. 두번째로 구개판의 상승 및 방향전이를 거쳐 양측의 구개판이 혀의 상방에서 수평방향으로 접근하게 되고, 세번째는 마주한 두 구개판의 상피성 융합, 마지막으로 융합상피의 제거와 이에 따른 간엽조직의 융합이 이루어지게 된다. 이러한 구개형성과정 중 마주한 양측의 구개판이 접촉한 후 내측단 상피(medial edge epithelium)는 정중 상피융합(midline epithelial seam)을 이루게 되며, 이는 신속히 제거되어 간엽조직에 의한 융합이 이루어지게 된다^{1,2)}.

구개열의 발생은 이러한 구개발생과정 중 구개판의 성장 결합, 구개판 상승의 실패, 구개판 융합의 실패, 또는 융합 후의 파열 등의 기전에 의해 발생할 수 있으며, 융합후 융합된 상피세포의 제거가 제대로 이루어지지 않는 것도 그 기전의 하나로 언급되어 왔다^{2,3)}.

Programmed cell death(PCD)는 Kerr등에 의해 형태학적으로 아포프토시스(Apoptosis)로 정의되었는데 이미 지정, 계획된 세포의 사망이라고 할 수 있으며 생체내의 조직이나 기관에서의 생리적인 세포제거 기전이다⁴⁾. 1972년 Kerr등⁵⁾은 아포프토시스의 형태학적 특징을 전자현미경 상에서 관찰, 기술하였는데 핵 염색체의 농축, 세포내 소기관의 밀집 그리고 세포 표면의 돌출현상 등이 나타난다고 기술하였다.

1951년 Glucksman⁶⁾은 구개발생과정에서 상피세포의 제거가 계획된 세포사망(programmed cell death)에 의한 것이라고 최초로 기술하였으며, 이후 많은 형태학적, 조직화학적 연구들에 의해 이러한 개념이 뒷받침 되었다. 1973년 Hudson과 Shapiro⁷⁾는 구개발생시 구개판 상피세포의 DNA합성이 구개판의 접촉 24-36시간 전부터 중단됨을 보고하고

이를 상피세포의 계획된 세포사망의 증거로 제시하였으며, 1974년 Hinrichsen과 Stevens⁸⁾는 전자현미경 상에서 아포프토시스의 형태학적 변화가 구개판 융합시 내측단상피에서 일어남을 관찰하였다.

그러나, 최근의 세포표지(cell labelling)를 이용한 연구들은 구개발생시 융합부위 상피세포의 제거과정을 아포프토시스보다는 상피세포의 간엽조직세포로의 전환^{9,10)}, 또는 융합 상피세포의 구강 또는 비강상피로의 이주¹¹⁾로 설명하였다.

초기의 아포프토시스의 확인방법은 주로 Kerr등이 설명한 형태학적인 특징을 가지고 구별하는 것으로, 이러한 형태학적인 특징은 매우 짧은 시간동안만 지속되므로 실제 일어나는 아포프토시스를 상당부분 지나칠 수 있었다⁴⁾. Umansky¹²⁾, Motyka¹³⁾등은 이러한 형태학적 요소를 나타내는 세포외에도 형태학적으로 완전한 세포에서도 DNA분절현상을 동반하는 아포프토시스가 일어나며 DNA 분절현상이 아포프토시스의 가장 특징적인 현상이라는 사실을 밝혀내었다. 따라서 오늘날에는 DNA의 3'-OH의 말단에 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase를 이용하여 여러 가지 물질을 DNA의 파절부위에 결합시킨 후 결합시킨 물질에 대한 면역화학적 반응을 이용하여 아포프토시스를 인지하는 방법이 개발되게 되었다. 1992년 Gavrieli⁴⁾등이 DNA의 파절부위의 3'-OH 말단에 biotinylated deoxyuridine을 결합시켜 이에 대한 항원-항체반응으로 염색하는 방법(TUNEL method)을 개발한 후 현재에는 biotinylated deoxyuridine에 degoxigenine이라는 거대분자를 결합시켜 항원-항체 반응을 극대화시킨 TdT방법을 개발하여 실제적인 아포프토시스를 보이는 세포의 분획을 거의 확실하게 알 수 있게 되었다¹⁴⁾.

1994년 Mori¹⁵⁾등과 1995년 Taniguchi¹⁶⁾등은 TUNEL method를 이용하여 구개발생시의 융합상피세포에서 아포프토시스가 일어남을 관찰하였으나, Mori등은 아포프토시스가 구개융합의 후반기에만 나타나고 구개판의 접촉 전과 접촉 직후에는 나타나지 않는다고 보고하였고 Taniguchi등은 아포프토시스가 구개판의 융합이 일어나기 전 구개판의 내측단 상피세포에서도 일어남을 보고하여, 서로 다른 결과를 보여주었다.

이에 저자는 구개발생시 융합된 상피세포의 퇴행성 변화가 아포프토시스에 의해 이루어짐을 확인하고, 아포프토시스가 일어나는 시기와 위치를 규명하

고자 발생중인 흰쥐 태아의 구개부위를 TdT 방법을 이용하여 관찰하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

체중 200gm 내외의 암컷 흰쥐 (Sprague-Dawley rat) 12마리와 체중 250gm 내외의 수컷 흰쥐 4마리를 실험동물로 사용하였다. 수컷 흰쥐1마리당 암컷 흰쥐 1마리를 한 우리에 넣고 교배를 유도하기 위해 하룻밤 (PM 8:00-AM 8:00) 을 지낸 후 분리시켰다. 교배가 유도된 날의 오전 2시를 임신 0일로 계산하였으며, 임신 15일 경에 육안으로 암컷 흰쥐의 임신여부를 확인할 수 있었다. 이때 4마리의 암컷 흰쥐가 임신된 것을 확인하였으며, 계획에 따라 16.0, 16.5, 16.75, 17.0 일에 각 1마리씩의 임신된 흰쥐를 과량의 마취제 (Ketamin 2.5ml/kg) 를 투여한 후 경추 탈구를 시켜 희생하여 각 흰쥐당 10-14마리의 태아를 얻을 수 있었다. 임신되지 않은 암컷흰쥐는 다시 교배를 유도, 3마리의 임신된 암컷 흰쥐를 얻었으며 16.5, 16.75, 17.0 일에 각 1마리씩 희생, 각 흰쥐당 10-12마리의 태아를 얻을 수 있었다.

2. 표본제작

희생된 흰쥐에서 얻은 태아를 4°C 10% 중성 포르말린에 최소한 48시간 고정 한 후 두부만을 절단하여 ethanol로 탈수하고 통법에 따라 파라핀 포매하였다. 제작된 파라핀 block은 16.0일 된 태아의 파라핀 block 5개와 16.5, 16.75, 17.0일 된 태아의 파라핀 block 각 10개씩을 무작위로 선정하여 4 μ m의 두께로 연속 전두 절단 (frontal serial section) 하였으며, silane coating된 glass slide각 하나에 연속된 2개씩의 절편을 위치시켰다.

3. 염색 및 관찰

H-E 염색은 통법에 따라 시행하였으며, 아포프토시스를 인지하기 위하여 TdT 염색 (In situ Terminal Deoxy-nucleotidyl Transferase & anti digoxigenine peroxidase method) 을 사용하였는데 (Apoptag Peroxidase kit S7100, Oncor) 세부 술식은 다음과 같다. 파라핀 절편을 통법에 따라 탈파라핀 및 합수시킨

후 4°C에서 Proteinase K (20 μ g/ml) 로 15분간 처리한 다음 3.0% nonspecific Hydrogen Peroxide를 사용하였다. Equilibration buffer로 수세한 다음 한시간 동안 37°C humidified chamber에서 TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) enzyme에 incubation시킨 후 실온에서 Stop wash buffer로 10분간 incubation시켰다. Anti Digoxigenin Peroxidase법을 이용하였고, 발색은 Diaminobenzidine (DAB) 을 사용하였으며, Methyl green으로 대조염색 한 후 발삼으로 봉입하였다.

H-E 염색은 각 파라핀 block에서 60 μ m당 1개씩의 glass slide에서 시행하였으며 TdT염색은 조직의 절단상태가 양호하고 H-E 염색조건에서 각 발생단계가 형태학적으로 잘 관찰되고 있는 glass slide의 연속절편상 바로 다음순서인 glass slide상에서 시행되었다. 16.0일 태아, 16.5일 태아의 구개관 접촉전과 후, 16.75일 태아의 정중상피융합 형성시, 16.75일 태아의 상피점 형성시와 17.0일 태아의 6개의 발생단계에서 각 6장씩의 glass slide가 선별되었으며, 한 발생과정을 보여주는 6장의 glass slide는 각기 다른 개체의 태아에서 얻은 것으로 선별하였다.

광학현미경 상에서 H-E 염색조건은 40배와 100배, TdT 염색 조건은 100배와 200배로 관찰하였다.

III. 연구 성적

1. 16.0일 태아의 소견

16.0일 된 태아의 H-E 염색 소견에서 발생중인 비중격 (nasal septum) 과 혀 (tongue)를 볼 수 있었으며, 혀의 외측에서 수직 방향으로 성장해 내려오는 구개관 (palatal shelf) 을 볼 수 있었다 (Fig. 1). 동일 부위의 TdT 염색 소견에서 구개관의 내측단 상피 (medial edge epithelium) 세포와 하방의 간엽조직 (mesenchymal tissue) 세포를 볼 수 있었으나, 양쪽 모두에서 아포프토시스 (apoptosis) 세포는 관찰되지 않았다 (Fig. 2, Table 1).

2. 16.5일 태아의 구개관 접촉 전 소견

동일 모체에서 얻은 태아사이에서도 발생단계가 약간씩 다르게 나타났으며, 여러개의 태아를 연속절단 함으로써 구개관 접촉 직전과 구개관 접촉 직후 양측 구개관의 상피세포의 융합을 관찰할 수 있었다.

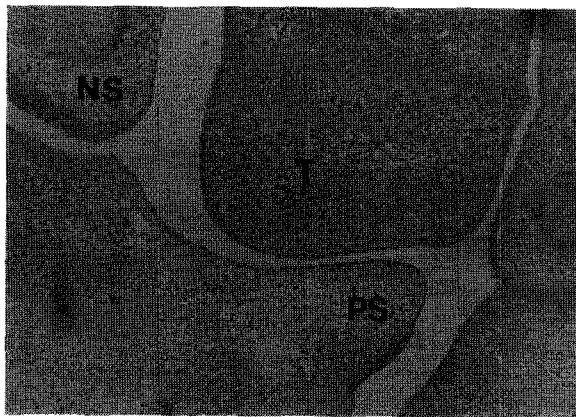


Fig. 1. Frontal section through palatal region of 16.0 day embryo (H-E×100) - Maxillary palatal shelf situated vertically alongside the tongue. PS : palatal shelf, T : tongue, NS : nasal septum.



Fig. 2. Frontal section through palatal region of 16.0 day embryo (TdT×200) - Epithelial cells and mesenchymal cells of palatal shelf are all negative for TdT staining. ME E : medial edge epithelium, MT : mesenchymal tissue.



Fig. 3. Ant. Palatal region of 16.5 day embryo. Palatal shelves are prior to contact (TdT×100) - Palatal shelves are elevate at a horizontal position above the dorsum of tongue and approximate each other.

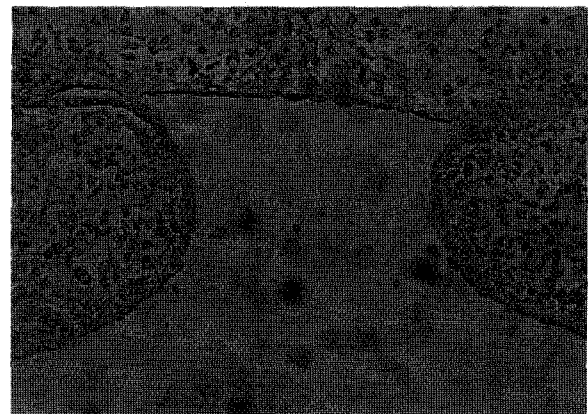


Fig. 4. Ant. Palatal region of 16.5 day embryo. Palatal shelves are prior to contact (TdT×200) - No TdT positive cells are observed in both epithelium and mesenchymal tissue.

Table 1. Apoptotic cells of palatal region of 16.0 day embryo.

Site	MEE	OE	NE	MT
Apoptotic cells	-	-	-	-

- no positive cell, MEE medial edge epithelium, OE oral epithelium NE nasal epithelium, MT mesenchymal tissue.

Table 2. Apoptotic cells of ant. palatal region of 16.5 day embryo (Palatal shelves are prior to contact).

Site	MEE	OE	P/S	MT
Apoptotic cells	-(+)	-(+)	-	-

- no positive cell, -(+) only 1 or 2 samples exhibit 1 to 3 positive cells, MEE medial edge epithelium, OE oral epithelium, P/S palatal-septal junction, MT mesenchymal tissue.

Table 3. Apoptotic cells of post. palatal region of 16.5 day embryo (Palatal shelves are prior to contact).

Site	MEE	OE	NE	MT
Apoptotic cells	-(+)	-	-	+

- no positive cell, -(+) only 1 or 2 samples exhibit 1 to 3 positive cells, + 1 to 3 positive cells, MEE medial edge epithelium, OE oral epithelium, NE nasal epithelium, MT mesenchymal tissue.

Table 4. Apoptotic cells of ant. palatal region of 16.5 day embryo (Palatal shelves are in contact).

Site	MEE	OE	P/S	MT
Apoptotic cells	+	-	-	-

- no positive cell, + 1 to 3 positive cells, MEE medial edge epithelium, OE oral epithelium, P/S palatal-septal junction, MT mesenchymal tissue.

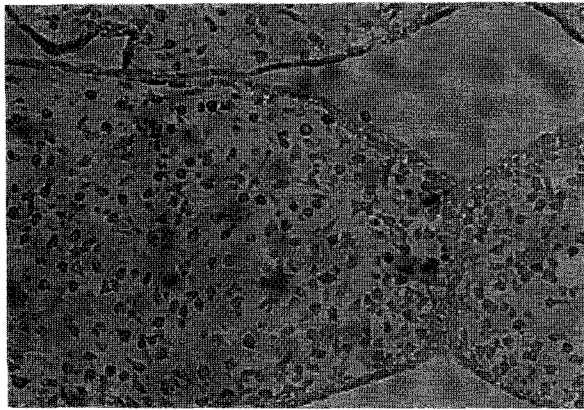


Fig. 5. Ant. Palatal region of 16.5 day embryo. Palatal shelves contact each other (TdT× 200) - Some positive cells (arrow) appear in the fused medial edge epithelium.

구개전방부 소견에서 양측 구개판이 거의 상방으로 거상되어 수평방향으로 서로를 향해 근접하고 있는 것을 볼 수 있었으며, 상방의 비중격은 하방 성장하여 구개판과 접촉하고 있는 것을 볼 수 있었다

Table 5. Apoptotic cells of post. palatal region of 16.5 day embryo (Palatal shelves are in contact).

Site	MEE	OE	NE	MT
Apoptotic cells	-(+)	-	-	-

- no positive cell, -(+) only 1 or 2 samples exhibit 1 to 3 positive cells, MEE medial edge epithelium, OE oral epithelium, NE nasal epithelium, MT mesenchymal tissue

(Fig. 3). 상피세포와 간엽조직 세포 모두에서 아포프토시스는 거의 관찰되지 않았으며, 12개의 절편 중 단지 2개에서만 소수의 아포프토시스 세포가 내측단 상피와 구강상피 (oral epithelium)에서 관찰되었다 (Fig. 4, Table 2).

구개 후방부의 소견에서는 양측 구개판이 서로를 향해 근접하고 있으나, 비중격은 구개판과 접촉하지 않고 있음을 볼 수 있었다. 간엽조직 내에서는 소수의 아포프토시스 세포를 관찰할 수 있었으나, 내측단 상피에서는 양성반응이 거의 관찰되지 않았다 (Table 3).

3. 16.5일 태아의 구개판 접촉 후 소견

구개 전방부의 소견에서 양측 구개판이 접촉하여 상피세포에 의한 융합이 이루어지고 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 융합되고 있는 내측단 상피에서 약간의 아포프토시스 세포를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5, Table 4).

구개 후방부의 절편에서 역시 양측 구개판이 접촉되고 있는 것을 볼 수 있었으며, TdT 염색 소견에서 양성반응은 거의 관찰되지 않고 있었으나, 한 개의 절편에서만 융합중인 내측단 상피 내의 소수의 아포프토시스 세포를 관찰할 수 있었다 (Table 5).

4. 16.75일의 태아의 정중 상피융합 형성시의 소견

16.75일 태아에서는 시편에 따라 발생단계에서 약간씩의 차이를 보였으며, 태아의 발생단계에 따라 융합된 내측단 상피세포에 의해 이루어진 정중 상피융합 (midline epithelial seam) 이 이루어진 양상과 정중 상피융합이 연속성을 잃고 여러개의 상피섬 (epithelial island) 들로 나뉘어지며 간엽조직에 의한 융

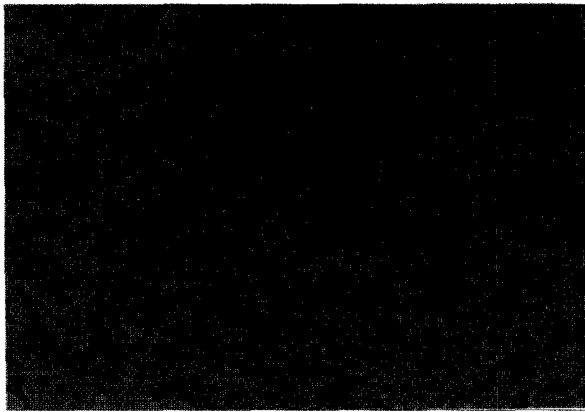


Fig. 6. Ant. Palatal region of 16.75 day embryo (TdT×200) - TdT positive cells rarely seen in the midline epithelial seam. But epithelial triangles (arrow) and epithelial fusion line between the dorsal palate and nasal septum (arrow head) are abundant in positive cells.

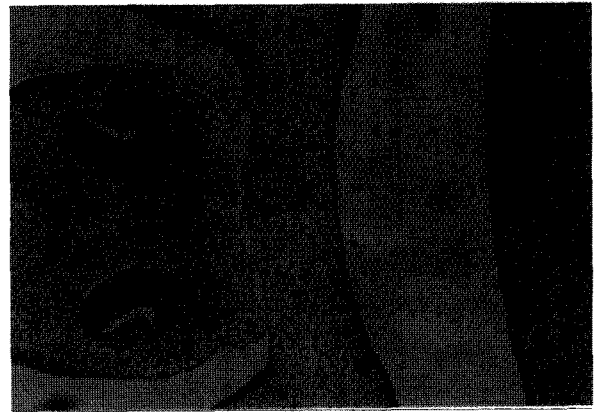


Fig. 7. Ant. Palatal region of 16.75 day embryo. Midline epithelial seam disrupted (H-E×100) - Midline epithelial seam begins to break down into discontinuous epithelial islands (arrow).

Table 6. Apoptotic cells of ant. palatal region of 16.75 day embryo (Midline epithelial seam is formed).

Site	ES	ET(O)	ET(N)	OE	P/S(M)	P/S(L)	MT
Apoptotic cells	-(+)	+++	++	-(+)	+	++	-(+)

-(+) only 1 or 2 samples exhibit 1 to 3 positive cells, + 1 to 3 positive cells, ++ 4 to 7 positive cells, +++ more than 7 positive cells, ES epithelial seam, ET epithelial triangle (O oral aspect N nasal aspect), OE oral epithelium, P/S palatal-septal junction (M mid portion L lateral portion), MT mesenchymal tissue.

Table 7. Apoptotic cells of post. palatal region of 16.75 day embryo (Midline epithelial seam is formed).

Site	ES	ET(O)	ET(N)	OE	NE	MT
Apoptotic cells	-(+)	++	+	-	-	-

- no positive cell, -(+) only 1 or 2 samples exhibit 1 to 3 positive cells, + 1 to 3 positive cells, ++ 4 to 7 positive cells, ES epithelial seam, ET epithelial triangle (O oral aspect N nasal aspect), OE oral epithelium, NE nasal epithelium, MT mesenchymal tissue.

합이 이루어지기 시작하는 양상을 관찰할 수 있었다.

구개 전방부의 소견에서 정중 상피융합이 이루어지는 시기에는 비중격과 구개판 사이에서도 비슷한 양상의 융합이 이루어지고 있는 것을 관찰할 수 있

었으며, 정중 상피융합의 구강 측과 비중격 측에서는 다수의 상피세포가 모여 상피삼각 (epithelial triangle) 을 이루고 있는 모습을 볼 수 있었다. TdT 염색 소견에서 정중 상피융합의 중앙 부위에서는 아포프토

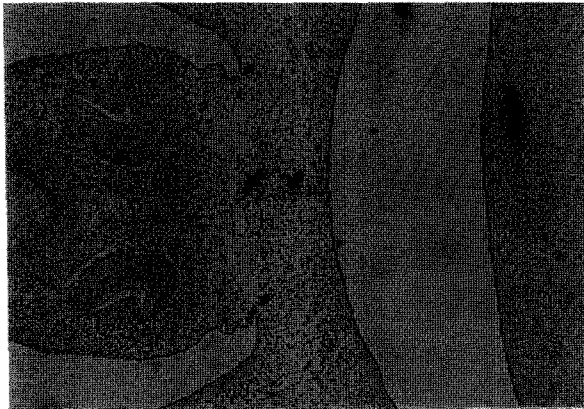


Fig. 8. Ant. Palatal region of 16.75 day embryo. Mid-line epithelial seam disrupted (TdT×100) - many TdT positive cells alongside the midline (arrow) and lateral portion of palatal-septal junction (arrow head) are seen.

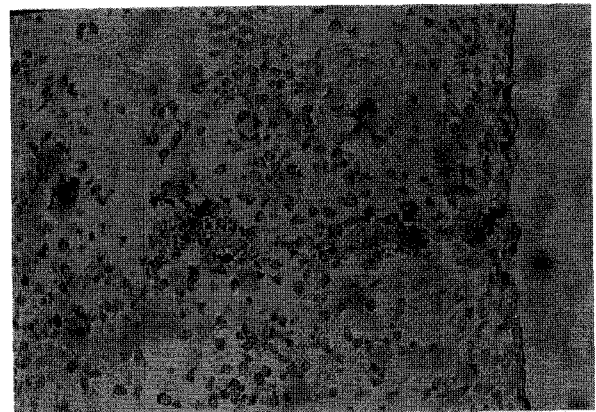


Fig. 9. Ant. Palatal region of 16.75 day embryo. Mid-line epithelial seam disrupted (TdT×200) - Epithelial islands and epithelial triangles are abundant in TdT positive cells (arrow).

Table 8. Apoptotic cells of ant. palatal region of 16.75 day embryo (Epithelial islands are formed).

Site	EI	ET(O)	ET(N)	OE	P/S(M)	P/S(L)	MT
Apoptotic cells	+++	++	+++	+	.	+++	-(+)

-(+) only 1 or 2 samples exhibit 1 to 3 positive cells, + 1 to 3 positive cells, ++ 4 to 7 positive cells, +++ more than 7 positive cells, EI epithelial island, ET epithelial triangle (O oral aspect N nasal aspect), OE oral epithelium, P/S palatal-septal junction (M mid portion L lateral portion), MT mesenchymal tissue.

시스가 거의 일어나지 않고 있는 것을 볼 수 있었으나 구강과 비중격 측의 상피삼각 부위에서는 다수의 아포프토시스 세포들을 관찰할 수 있었고, 또한 비중격과 구개판 사이의 융합부위, 특히 비중격의 외측연과 융합되는 부위에서도 다수의 아포프토시스 세포들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6, Table 6).

구개 후방부 소견에서 역시 정중 상피융합이 이루어진 것을 관찰할 수 있었으며, 정중 상피융합의 중앙부위에서는 아포프토시스 세포가 거의 보이지 않았으나, 상피삼각 부위에서는 몇 개의 아포프토시스 세포를 확인할 수 있었다 (Table 7).

5. 16.75일의 태아의 상피섬 형성시의 소견

구개 전방부의 H-E 소견에서 정중 상피융합은 연

속성을 잃고 상피섬과 상피삼각으로 분리된 양상을 볼 수 있었으며, 이때 상피삼각에는 많은 수의 상피세포들이 모여 있는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 7). TdT 염색 소견에서는 상피섬과 상피삼각, 그리고 비중격의 외측연과 구개판이 만나는 부위에서 상당히 많은 수의 아포프토시스 세포들을 관찰할 수 있었고, 구강 상피 내에서도 몇 개의 아포프토시스 세포들을 볼 수 있었다 (Fig. 8,9, Table 8).

구개 후방부의 소견에서도 상피섬이 형성된 양상을 볼 수 있었고 상피섬과 상피삼각부위, 구강, 비강상피에서 상당수의 아포프토시스 세포들을 관찰할 수 있었으며, 특히 비강측의 상피삼각부위에는 TdT 양성반응을 보이는 상피세포들이 상당히 많이 밀집되어 있는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 10, Table 9).

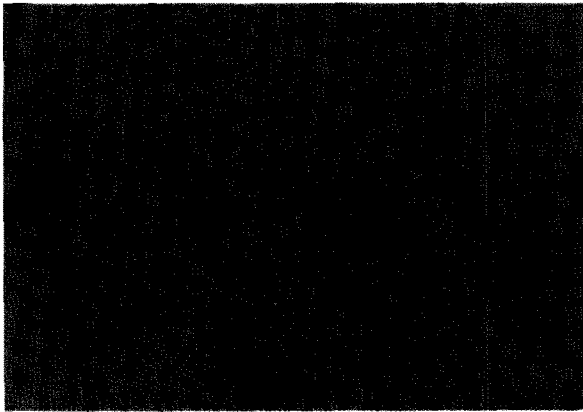


Fig. 10. Post. Palatal region of 16.75 day embryo. Midline epithelial seam disrupted (TdT×200) - Nasal epithelium is abundant in TdT positive cells (arrow).

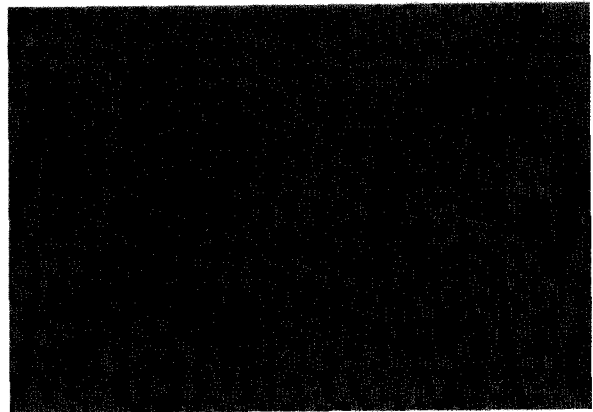


Fig. 11. Ant. Midpalatal region of 17.0 day embryo (TdT×200) - No TdT positive cells are observed in the mesenchymal confluence. But some positive cells (arrow) are seen in the epithelial triangle.

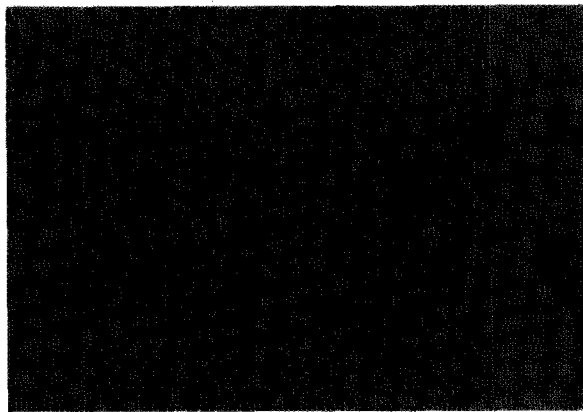


Fig. 12. Post. Palatal region of 17.0 day embryo (TdT×200) - some TdT positive cells are seen in the oral and nasal epithelia (arrow) and alongside the midline (arrow head).

6. 17.0일 태아의 소견

구개 전방부 소견에서는 상피섬이 거의 소실 되어 간엽조직에 의한 융합이 거의 완성되어 가고 있는 모습을 볼 수 있으며 상피섬을 대치하고 있는 간엽조직 내에서는 아포프토시스를 거의 관찰할 수 없었으나 상피삼각 부위와 비중격과 구개가 융합된 부위, 특히 비중격의 외측면 부근에서는 아직도 약간의 아포프토시스 세포들을 확인할 수 있었다 (Fig. 11, Table 10).

구개 후방부에도 역시 상피섬이 많이 소실된 양상을 볼 수 있었으며 아직도 상피삼각 특히 비강측 상피삼각과 비강상피에서는 아직도 많은 수의 아포프토시스 세포들이 관찰되었다 (Fig 12, Table 11).

IV. 총괄 및 고안

최근 아포프토시스는 생체의 정상 발생 과정에서 가장 중요한 현상의 하나로 인식되게 되었다. 이는 불필요한 부위의 세포를 선택적으로 제거함으로써 정상적인 형태발생에서 중요한 역할을 하고, 세포의 증식과 사망의 균형을 조절함으로써 복잡한 조직, 기관 발생을 가능케 한다^{17,18)}.

과거에는 조직이나 기관에서 세포의 수를 조절하는 기전을 주로 세포의 증식으로 설명하였으나, 오늘날에는 세포의 증식과 사망의 비율이 전신호르몬이나 국소적인 성장인자들에 의해 조절됨으로써 세포수의 조절이 이루어진다고 보고 있다⁴⁾. 따라서 최근에는 세포의 주기를 일반적인 증식세포주기 (proliferative cell cycle) 와 사망세포주기 (death cell cycle) 로 설명을 함으로써 세포의 운명을 완벽하게 설명하는 것이 가능하게 되었다^{19,20)}.

아포프토시스는 세포의 핵내 효소의 활성화에 의해 조절되는 기전 즉 유전자에 의해 조절을 받는 현상으로 밝혀졌다. 또한 아포프토시스는 생체내 세포제거 기전 중 하나인 괴사와는 몇 가지 면에서 형태학적으로

Table 9. Apoptotic cells of post. palatal region of 16.75 day embryo (Epithelial islands are formed).

Site	EI	ET(O)	ET(N)	OE	NE	MT
Apoptotic cells	++	++	+++	++	++	+

+ 1 to 3 positive cells, ++ 4 to 7 positive cells, +++ more than 7 positive cells, EI epithelial island, ET epithelial triangle (O oral aspect N nasal aspect), OE oral epithelium, NE nasal epithelium, MT mesenchymal tissue.

Table 10. Apoptotic cells of ant. palatal region of 17.0 day embryo.

Site	EI	ET(O)	ET(N)	OE	P/S(M)	P/S(L)	MT
Apoptotic cells	-	+	++	-	-	+	-

- no positive cell, + 1 to 3 positive cells, ++ 4 to 7 positive cells, EI epithelial island, ET epithelial triangle (O oral aspect N nasal aspect), OE oral epithelium, P/S palatal-septal junction (M mid portion L lateral portion), MT mesenchymal tissue.

Table 11. Apoptotic cells of post. palatal region of 17.0 day embryo.

Site	EI	ET(O)	ET(N)	OE	NE	MT
Apoptotic cells	-	+	++	+	++	+

- no positive cell, + 1 to 3 positive cells, ++ 4 to 7 positive cells, EI epithelial island, ET epithelial triangle (O oral aspect N nasal aspect), OE oral epithelium, NE nasal epithelium, MT mesenchymal tissue.

로 유사하지만 뚜렷한 차이점을 가지고 있는데 첫째 괴사는 오로지 병리학적인 세포외적 변화로 원형질막의 투과성 변화에 기인하는 수동적인 기전인 반면 아포프토시스는 에너지에 의존한 능동적 과정이며²¹⁾ 둘째 괴사는 비특이적 인자에 의해 야기되는 반면 아포프토시스는 조직특이적 인자에 의해 시작된다²²⁾. 셋째 괴사는 핵 변화 이전에 원형질막의 붕괴가 시작되지만 아포프토시스는 원형질막의 변화 이전에 핵 변화가 시작된다²¹⁾. 넷째 괴사는 세포내 소기관의 기능 및 구조가 파괴되지만 아포프토시스는 세포내 소기관의 기능 및 구조가 손상되지 않으면서 진행된다¹⁹⁾.

이러한 아포프토시스를 확인하는 방법에는 여러 가지가 있는데 초기에 사용하던 형태학적 특징을 이용하여 구별하는 방법은 이러한 형태학적 특징이 단지 몇 분에 걸쳐서만 나타나고 세포의 파괴로 인해

형성된 아포프토시스 세포체 (apoptotic body) 가 주위의 조직내 대식세포 (macrophage) 등에 의해 곧바로 포식되고 이는 자식포 (autophagosome) 와 형태학적으로 유사하기 때문에 구별에 어려움이 많았다. 반면 아포프토시스의 DNA 분절현상은 형태학적인 특징을 나타내는 아포프토시스 세포 뿐 아니라 형태학적으로는 완전하면서도 아포프토시스 과정을 거치는 세포에서도 나타나므로 이를 이용한 염색은 보다 민감한 구별을 가능케 하였다⁴⁾.

Hinrichsen과 Stevens⁸⁾는 흰쥐의 구개발생 과정을 전자현미경을 통해 관찰하여 상피세포에서의 변화를 기술하였는데, 구개판이 서로를 향해 근접하는 동안 최상층의 편평상피세포층이 분리되어 하부의 세포층이 표면으로 노출되고 표면세포에서 미소융모형 돌기 (microvillous projection) 들과 사상 피막 (filamentous surface coat) 들이 관찰됨을 보고하였다. 그

들은 이러한 것들을 통해 구개판들이 서로를 특이적으로 인지하여 유착되게 된다고 주장하였고, 구개판의 융합 전과 후 모두에서 상피세포의 아포프토시스가 나타났다고 보고하였다.

본 연구에서는 광학현미경을 통한 관찰만을 시행하였기 때문에 이러한 미세구조들을 확인할 수는 없었지만, 구개판의 접촉 전과 직후에 상피세포의 아포프토시스가 나타나지 않는 것으로 보아 아포프토시스가 구개판의 접촉과 상피세포간의 융합에는 직접적으로 관여하지는 않는 것으로 생각된다. 오히려 양측 구개판의 내측단 상피세포는 이 시기에 상피세포의 융합을 위해 필요한 세포 유착분자 (cell adhesion molecule) 와 교소체 (desmosome) 의 형성을 위해 온전하게 유지되어야 하며 Smiley²³⁾가 주장한 바와 같이 조기의 상피세포의 사망은 정상적인 상피성 융합을 방해하여 구개열을 야기할 수도 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 H-E 염색 소견과 TdT 염색의 저배율 (x100) 에서의 관찰을 통해 구개판의 성장이 초기 (16.0일 태아) 에는 수직적인 방향으로 진행되다가 구개판의 거상과 혀의 하방 전위를 거쳐 구개판의 성장이 수평적인 방향으로 바뀔 수 있었으며 (16.5일 태아), 이는 이전의 많은 연구들에서 언급된 바와 동일하였다^{1,3,8,24)}. 이러한 구개판의 거상은 매우 짧은 시간동안 이루어지는 것으로 알려져 있는데, 구개판 내부의 내재된 힘이 점점 증가하다가 이에 저항하는 힘 (예; 혀에 의한 마찰 저항) 을 극복할 수 있는 역치에 도달함에 따라 순간적으로 이루어지는 것으로 보고되었다²⁵⁾. 이때 내재된 거상력 (intrinsic elevating force) 에는 여러 가지가 작용하지만 주된 요인은 국소적인 glycosaminoglycan, 특히 hyaluronic acid의 증가에 의한 것으로^{25,26)}, 이러한 hyaluronic acid의 국소적인 축적은 세포외 간질(extracellular matrix) 의 팽창을 야기시키며 간엽조직 세포에 의한 hyaluronic acid의 생성은 EGF (epidermal growth factor)²⁷⁾ 와 TGF β (trans-forming growth factor β)³⁾ 에 의해 촉진된다고 알려져 있다.

본 연구에서 관찰된 16.5일 된 태아의 절편 중 조직 조작중의 부주의로 구개의 정중선 부근에서 파열이 일어난 절편이 있었는데, 파열이 융합된 양측 구개판의 상피 사이에서가 아닌 상피와 간엽조직 사이 또는 간엽조직 내에서 일어난 것을 관찰할 수 있었다. 이는 양측 구개판이 단순히 구개판의 빠른 성장에 의한 물리적인 힘에 의해 접촉을 유지하고 있는 것이 아니라

상피간에 실제적인 융합이 일어나는 것을 입증해 주고 있다. 이러한 마주하는 구개판의 내측단 상피세포간의 융합은 세포표면의 점착성의 당단백 피막 (sticky cell surface glycoprotein coat)과 교소체(desmosome) 에 의해 이루어 지는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

1992년 Griffith와 Hay¹⁰⁾는 마우스 태아의 구개발생 과정에서 접촉전 구개판 내측단 상피세포를 지용성 색소 (lipid soluble dye)인 CCFSE(carboxydichlorofluorescein diacetate succinimidyl ester)를 사용하여 표지하였으며 이 상피세포들이 구개판 융합과정에서 간엽조직 세포로 전환되어 최종적으로 섬유아세포로 남게 된다고 주장하였다. 그들은 침투된 색소가 상피세포내에 자가 용해소체 (autophagic vacuole) 와 비슷한 격리소체 (isolation body) 의 형태로 존재하고 구개판 융합후의 간엽조직 세포내에서도 이러한 격리소체가 관찰됨을 내측단 상피세포의 전환의 증거로 제시하였다. 그들은 또한 상피세포의 표지후 24시간 후에 정중상피 융합의 Gomori 염색을 시행하여 격리소체 내에 acid phosphatase가 존재하지 않음을 확인하고 이를 근거로 격리소체가 포식 용해소체 (phagolysosome) 가 아님을 주장하였다. 그러나 이 실험에서 그들은 간엽조직내에 존재하는 격리소체가 포식 용해소체와 무관함을 보여주지는 않았으며, 색소가 간엽조직 세포내에서 발견되는 것이 아포프토시스 (apoptosis) 를 일으킨 상피세포를 포식하기 때문일 수 있다는 가능성을 배제하지는 못한 것으로 생각된다.

1992년 Carette와 Ferguson¹¹⁾은 역시 마우스의 구개발생과정에서 DiI이라는 색소를 이용하여 상피세포를 표지하였고 구개융합과정에서 대부분의 구개판 내측단 상피세포들이 구강, 비강상피로 이주하여 최종적으로 구강, 비강상피로서 기능하게 되며 상피세포의 간엽조직 세포로의 전환이나 아포프토시스의 어떠한 증거도 확인할 수 없었다고 주장하였다. 본 실험에서는 세포표지를 이용하지는 않았기 때문에 상피세포의 이주가 일어남을 직접적으로 확인하지는 못하였지만, 구개판 접촉 후 정중 상피융합의 형성과 분열과정에서 상피삼각부위에 상피세포가 많이 모이는 것으로 보아 상피세포의 이주가 일어났을 가능성은 있는 것으로 생각된다. 또한 구개융합 후반기에 상피삼각부위와 구강, 비강 상피에서 아포프토시스가 많이 일어나는 사실로 보아 이주가 일어나더라도 이주된 상피세포는 상피삼각과 구강, 비강상피내에서 대부분 아포프토시스에 의해 제거되는 것으로 생각

된다.

본 실험에서는 구개발생과정 중 융합된 내측단 상피세포에 의해 형성된 상피삼각과 상피섬에서 TdT 염색에 양성반응을 보이는 세포가 많이 나타나는 것으로 보아 내측단 상피세포가 아포프토시스에 의해 제거됨을 확인할 수 있었으며 구개전방부의 구개판과 비중격이 융합되는 부위에서도 마찬가지로 융합된 상피세포의 제거가 아포프토시스에 의해 이루어짐으로써 간엽조직에 의한 융합이 이루어진다는 사실을 관찰할 수 있었다. 아포프토시스는 구개판의 접촉전과 접촉 후에는 거의 나타나지 않음으로 아포프토시스가 양측 구개판의 서로의 인지와 접촉, 상피세포의 융합에는 직접적으로 관여하지 않는 것으로 보인다.

본 연구에서는 융합된 상피세포의 간엽조직 세포로의 전환이나 구강, 비강상피로의 이주를 직접적으로 반박 또는 지지할 수 있는 근거를 제시하지는 못함으로 융합된 상피세포의 제거에 이러한 다른 기전이 관여한다는 가능성을 배제하지는 못하였지만, 아포프토시스가 상피세포의 제거에 관여함으로써 구개 융합을 완성하는데 중요한 역할을 한다는 사실을 밝혀주고 있다.

관찰할 수 없었으나, 비강측과 구강측의 상피삼각 그리고 비중격과 구개판이 접촉하는 부위, 특히 비중격의 외측연과 접촉하는 부위에서는 다수의 아포프토시스 세포들이 관찰되었다.

4. 16.75일 된 태아의 표본에서 정중 상피융합이 연속성을 잃고 상피섬들로 나뉘어지는 시기에서는 상피섬과 상피삼각부위에서 많은 수의 아포프토시스 세포들을 볼 수 있었으며 근접한 구강, 비강상피에서도 다수의 아포프토시스 세포들을 관찰할 수 있었다.
5. 17.0일 된 태아의 표본에서 상피섬이 많이 소실되어 간엽조직에 의한 융합이 이루어지고 있는 부위에서는 아포프토시스 세포들이 거의 관찰되지 않았으나 상피삼각부위와 구강, 비강상피에서는 아직도 다수의 아포프토시스 세포들을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 흰쥐 태아의 구개발생시 구개융합부위의 상피세포가 아포프토시스에 의해 제거되며 이러한 아포프토시스에 의한 융합상피세포의 제거는 주로 구개융합의 후반기에 상피섬과 상피삼각 부위에서 일어난다는 사실을 알 수 있었다.

V. 결 론

참 고 문 헌

본 연구에서는 구개발생시 융합된 상피세포의 제거가 아포프토시스에 의해 이루어짐을 확인하고 아포프토시스가 일어나는 시기와 위치를 확인하기 위해 체중 200gm 내외의 암컷 흰쥐 12마리를 수컷 흰쥐와 교배시켜 얻은 16.0일, 16.5일, 16.75일, 17.0일 태아의 조직절편에 H-E 염색과 TdT 염색을 시행한 후 광학현미경을 통해 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 16.0일 된 태아의 표본에서 수직적으로 발생중인 구개판의 내측단 상피에서는 아포프토시스를 거의 발견할 수 없었다.
2. 16.5일 된 태아의 표본에서 수평방향으로 근접중인 양측 구개판의 내측단 상피에서는 아포프토시스를 거의 관찰할 수 없었으며, 구개판의 접촉 직후 상피세포간의 융합이 이루어지는 부위에서는 극히 소수의 아포프토시스 세포들만이 관찰되었다.
3. 16.75일 된 태아의 표본에서 연속성을 거의 잃지 않은 정중 상피융합에서는 아포프토시스를 거의

1. Farbman AI. Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Dev Biol* 1968 ; 18 : 93-116.
2. Greene RM, Pratt RM. Developmental aspects of secondary palate formation. *J Embryol Exp Morphol* 1976 ; 36 : 225-45.
3. Ferguson MWJ. Palate development. *Development* 1989 ; 103[Supple] : 41-60.
4. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992 ; 119 : 493-501.
5. Kerr JFR, Willie AH, Currie AR. Apoptosis : basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 ; 26 : 239-57.
6. Glucksman A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951 ; 26 : 59-86.
7. Hudson CD, Shapiro BL. A radioautographic study of deoxyribonucleic acid synthesis in embryonic rat palatal shelf epithelium with reference to the concept of programmed cell death. *Arch Oral Biol* 1973 ; 18 : 77-84.
8. Hinrichsen CFL, Stevens GS. Epithelial morphology du-

- ring closure of the secondary palate in the rat. *Arch Oral Biol* 1974 : 19 : 969-80.
9. Fitchet JE, Hay ED. Medial edge epithelium transforms to mesenchymes after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol* 1989 : 131 : 455-74.
 10. Griffith CM, Hay ED. Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion : carboxy-fluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development* 1992 : 116 : 1087-99.
 11. Carette MJM, Ferguson MWJ. The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro : an analysis by DiI labelling and confocal microscopy. *Development* 1992 : 114 : 379-88.
 12. Umansky SR. The genetic program cell death. Hypothesis and some applications : Transformation, carcinogenesis, aging. *J Theor* 1982 : 97 : 591-602.
 13. Motyca B, Reynolds JD. Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius : a possible role in B cell selection. *Eur J Immunol* 1991 : 21 : 1951-8.
 14. Bjorkerud S et al. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of granule and plaque instability. *Am. J. Pathol* 1996 : 149 : 367-80.
 15. Mori C, Nakamura N, Okamoto Y, Osawa M, Shiota K. Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation. *Anat Embryol* 1994 : 190 : 21-8.
 16. Taniguchi K, Sato N, Uchiyama Y. Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves during fusion. *Arch Histol Cytol* 1995 : 58 : 191-203.
 17. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991 : 7 : 663-98.
 18. Saunders JW JR. Death in embryonic systems. *Science* 1966 : 154 : 604-12.
 19. John TI. Role of programmed cell death in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 1993 : 101 (Supple 5) : 27-34.
 20. Zakeri ZF, Quaglini D, Latham T, Lockshin RA. Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB* 1993 : 7 : 470-78.
 21. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death : the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980 : 68 : 251-306.
 22. Wyllie AH. Glucocorticoid induces in thymocytes a nucleaselike activity associated with the chromatin condensation of apoptosis. *Nature* 1984 : 284 : 555-6.
 23. Smiley GR. Fine structure of mouse embryonic palatal epithelium prior to and after midline fusion. *Arch Oral Biol* 1970 : 15 : 289-96.
 24. Hayward AF. Ultrastructural changes in the epithelium during fusion of the palatal processes in rats. *Arch Oral Biol* 1969 : 14 : 661-78.
 25. Ferguson MWJ. Palatal shelf elevation in the Wister rat fetus. *J. Anat* 1978 : 125 : 555-77.
 26. Brinkley LL, Morris Wiman J. Computer assisted analysis of hyaluronate distribution during morphogenesis of the mouse secondary palate. *Development* 1987 : 100 : 629-36.
 27. Dixon MJ, Foreman D, Schor SL, Ferguson MWJ. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha regulate extracellular matrix production by embryonic mouse palate mesenchymal cells cultured on a variety of substrata. *Development* (in press) 1988.
 28. Greene RM, Kochhar DM. Surface coat on the epithelium of developing palatine shelves in the mouse as revealed by electron microscopy. *J Ebrlyol Exp Morphol* 1974 : 31 : 683-92.

- ABSTRACT -

A STUDY ABOUT THE APOPTOSIS OF EPITHELIAL CELLS IN THE FUSING FETAL RAT PALATE

Hong-Joo Lee, Kyung-Suk Cha, Jin-Woo Lee

Department of Dentistry, College of Dentistry, Dankook University

The purpose of this study was to prove that the medial edge epithelial cells covering the secondary palatal shelves were removed by apoptosis during palatal fusion.

12 mature female rats (Suprague-Dawley) were mated overnight with male rats and sacrificed on days 16.0, 16.5, 16.75, 17.0 of pregnancy. The embryos were removed from the uterus and the heads were embedded in paraffin. The paraffin blocks were sectioned and the sections were undergone H-E staining for general histologic feature and TdT staining for detection of apoptotic cells.

The obtained results were as follows.

1. In the section of 16.0 and 16.5 day embryos, the palatal shelves were prior to contact and no apoptotic cells were observed in the medial edge epithelium. At the initial contact of palatal shelves, there was a few apoptotic cells in the fusing epithelium.
2. In the 16.75 day embryos, the samples that epithelial seams did not lost there continuity, apoptotic cells were rarely seen at the midline epithelial seam. In contrast, a lot of apoptotic cells were observed at epithelial triangles and the junction between palatal shelves and nasal septum.
3. In the 16.75 day embryos, the samples that epithelial seams lost their continuity and disrupted to epithelial islands, large number, of apoptotic cells were observed at epithelial islands and epithelial triangles. Some apoptotic cells were also observed at the oral, nasal epithelium near the midline.
4. In the 17.0 day embryos, most of epithelial islands were disappeared and mesenchymal confluence was achieved. Apoptotic cells were rarely observed in the mesenchymal tissue which replaced epithelial islands, but there were some apoptotic cells at the epithelial triangles, oral and nasal epithelium.

From the results of the study, it was revealed that medial edge epithelial cells of fusing palate were removed by apoptosis. Apoptotic cells were found mainly in the disappearing midline epithelial seam and the oral and nasal epithelial triangles at some late stages of palatal fusion.

KOREA. J. ORTHOD. 2001 : 31(1) : 71-83

※ **Key words** : palatal fusion, apoptosis, TdT stain