

쥐의 치아 손상이 삼차 신경세포에서의 유도 열충격 단백질 70의 발현에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 *치과마취학교실, †치과보존학교실,
‡성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 마취과

백지원* · 백승호† · 윤태균† · 김현정* · 영광원*

= Abstract =

Induction of Heat Shock Protein 70 after Experimental Pulpal Exposure in Rats

Ji Won Baik, D.D.S.*, Seung Ho Baek, D.D.S.†, Tae Gyoon Yoon, M.D.†
Hyun Jeong Kim, M.D.*, and Kwang Won Yum, M.D.*

Departments of *Dental Anesthesiology, †Conservative Dentistry, Seoul National University
College of Dentistry, Seoul, Korea, ‡Department of Anesthesiology, Samsung Medical Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Inducible heat shock protein 70s (iHSP70) are expressed by stressful stimuli that result in protein denaturation, and are thought to assist in the maintenance of cellular integrity and viability. In addition, iHSP70 is known to be a sensitive marker of neuronal injury. To my best knowledge, no previous studies have been documented on iHSP70 induction by nociceptive impulse transmission through peripheral nerves not by direct neural damage. The purpose of this study was to examine the hypothesis that iHSP70 can be expressed in the nervous system, which is related to the dental nociceptive pathway, by tooth pulp inflammation.

Methods: The pulp of rat mandibular molars was exposed. Animals were sacrificed at 1, 4, and 7 days after pulpal exposure, and the pulps were evaluated histologically. Also, iHSP70 levels were examined in the Gasserian ganglion (GG) and the trigeminal sensory nucleus (TSN).

Results: At 4 days after pulpal exposure, iHSP70 was significantly more expressed in the ipsilateral GG than in the contralateral GG. In the histological study, inflammation was found in the entire pulp tissue at 4 days. There were no significant differences in iHSP70 levels between the ipsilateral TSN and the contralateral TSN. Also, there were no significant differences in iHSP70 expression of GG and TSN between both sides at 1 and 7 days after pulpal exposure.

Conclusions: These results suggest that iHSP70 can be expressed in the GG at 4 days after pulpal exposure by nociceptive impulses due to pulpal inflammation. (Korean J Anesthesiol 2002; 42: 831~836)

Key Words: Gasserian ganglion; heat shock protein 70; inflammation; pulp; trigeminal sensory nucleus.

논문접수일 : 2002년 6월 3일

책임저자 : 김현정, 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 치과대학 치과마취학교실, 우편번호: 110-744

Tel: 760-3042, Fax: 766-9427, E-mail: dentane@plaza.snu.ac.kr

석사학위 논문임.

본 연구는 서울대학교 치과대학 기금교수 학술연구비 지원으로 수행되었음.

서 론

Inducible heat shock protein (iHSP)은 다양한 자극들에 의해 세포 내에 축적되고 스트레스 내성 상태와 밀접한 관계가 있어, 초기 조직손상과 이후 손상에 대한 세포 보호 기전의 생물학적 지표로서 중요한 의미를 가지는 것으로 기대되어져 왔다.¹⁾

iHSP는 특히 고열, 허혈, 외독소 노출 및 단백질 변성을 유발시키는 그 밖의 스트레스 등의 스트레스 자극에 의해 유도되며, 세포의 보존과 생존가능성의 유지를 돕는 것으로 생각된다. 즉 대다수의 iHSP는 스트레스성 자극에 의해서 과발현되며, 단백질 변성과 물리화학적 손상에 노출되었을 때의 부적절한 폴리펩타이드 응집을 방지하여 세포의 생존을 증진시키는 것으로 알려져 있다.^{2,3)}

한편, 뇌허혈, 신경변성 질환, 간질 및 외상을 포함한 다양한 병적 상태에서 HSP가 신경계에서 유도되며, iHSP70은 신경세포 손상의 민감한 지표로 알려져 있다.⁴⁾ iHSP70의 과발현이 몇 가지 다른 신경계 손상 모형에서 보호작용을 하였고,⁵⁾ 최근의 연구 결과들 역시 신경세포 접합부와 같이 고도로 분화된 세포 구획에서 iHSP가 발현될 수 있음을 시사한다.⁶⁾ 그러나 말초신경을 통한 침해수용성 신경 전달에 의한 iHSP의 유도에 관한 이전의 연구는 없었다. 치수의 구심성 신경은 침해 수용기로서 작용하고, Gasserian ganglion (GG)을 통과하여 뇌간의 삼차신경감각핵(TSN)으로 전달된다. 따라서, iHSP70이 치수 내 일차 구심성신경으로부터의 신호에 의해 유도될 가능성이 있다. 이번 연구에서는 치통을 유발하는 치수염증에 의하여 삼차신경 전달로에 있는 신경조직에서 iHSP70이 발현될 수 있다는 가설을 세우고 이를 검증하고자 하였다.

대상 및 방법

동물실험은 세계통증연구학회(International Association for the Study of Pain)의 윤리규정에 의하여 시행되었다. 실험동물은 초기 체중 200-250 g의 웅성 Sprague-Dawley 쥐 18마리를 대상으로 12시간의 광주기성을 유지하며, 4-5마리씩 깔집이 있는 통에 사육하였다. 먹이와 물에 자유롭게 접근할 수 있고

록 하고 표준적인 먹이를 주었다. 실험 전 실험동물이 이러한 상태에 적어도 3일 동안 적응시켰다. 모든 동물들은 NIH 지침에 명기되어 있는 실험동물의 사육과 이용에 관한 지침 및 의식 하 동물에서의 실험적 통증 연구에 관한 윤리적 지침에 따라 다루었다.⁷⁾

우선 마취유도 상자(11 × 25 × 11.5 cm) 내에서 5 Vol% enflurane과 100% 산소 3 L/min의 지속적인 공급에 의해서 실험동물을 심마취하였다. 심도의 마취 하에서 물 냉각 없이 저속 핸드피스(Strongy 793, Söeshin, Korea)와 1/2 round bur를 이용하여 치수를 노출시키되 치근분지부가 뚫리지 않도록 하였다. 모든 실험동물에서 치수노출은 우측 제1대구치 교합면에서 시행하였다. 치수가 노출된 부분은 실험동물을 희생시키기 전까지 구강 내 환경에 노출되도록 두었다.

치수노출 후 1, 4, 및 7일 후 5 Vol% enflurane에 의한 심도의 마취 하에서 단두대를 사용하여 실험동물을 희생시켰다. 얼음 위에서 GG와 TSN을 적출하고 액화질소에 넣어 고정시키고 분석 전까지 -70°C의 deep freezer 내에 보존하였다.

한편, 치수에서의 시간 경과에 따른 염증의 정도를 관찰하기 위하여 구치를 포함한 하악체를 분리하여 10% formalin으로 고정하고 EDTA 용액으로 탈회시켰다. 시편을 6μm의 paraffin 절편을 작성한 후 hematoxylin-eosin (H & E) 염색을 하였다.

모든 신경조직 표본이 수집된 후 Western blot 분석에 의하여 조직 내 iHSP70을 정량하였다. 즉, 표본에 5 부피의 RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology, USA)를 첨가한 후 약 2분간 초음파 처리하였다. 원심분리로 모든 단백질을 추출해 내고 bio-rad protein assay reagent (Bio-Rad, USA)를 사용한 분광측광기로 정량하였다. 이온영동에는 12% (w/v) SDS-polyacrylamide gel (25 μg protein per lane)을 사용하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose transfer membrane (Schleicher and Schuell, Germany)으로 옮겼고, 비특이성 IgG는 3% BSA in tris buffered saline (TBS) 용액으로 차단하였다. 막들을 일차 항체인 1 : 1,000 goat polyclonal anti-carboxy terminus HSP70 (Santa Cruz biotechnology, USA)을 처리하여 밤새 배양하였다. TBS로 세척한 후에 배지를 1 : 2,000 peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (DAKO, Denmark)와 함께 2시간 동안 배양하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) systems (Pierce, USA)에 의해 특정

단백질 band를 발견하였다.

자료는 비모수적 방법인 Moses test (SPSS ver 10.0, USA)에 의해 분석하였다.

결 과

치수노출 1일 후 실험군에서는 치수노출 부위에 인접한 치수조직에서 괴사가 관찰되었고 다형핵백혈구(PMNs)와 같은 염증세포의 침윤은 치수조직의 상부에 국한되어 있었다. 치근 주위 조직에서는 아무

런 변화도 관찰되지 않았다(Fig. 1). 치수노출 4일 후에는 치수조직의 상부에서 괴사가 관찰되었고 염증세포의 침윤이 전체 치수조직에 걸쳐서 확산되어 급성 치수염의 소견을 보였다(Fig. 2). 치수노출 7일 후에는 더 진행된 치수염이 관찰되었는데, 치수괴사가 치근단까지 확산되었고 치근단 조직에 약간의 염증 소견이 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3).

치수 노출 동측(ipsilateral)과 반대측(contralateral) GG와 TSN에서 iHSP70 발현을 Western blot을 통하여 확인할 수 있었다. 객관적인 관찰을 위하여 발현된

Fig. 1. Histological image from the molar, whose pulp was exposed after 1 day. Necrosis was observed in the pulpal tissue adjacent to the exposure and the infiltration of the inflammatory cells were confined to the upper part of the pulpal tissue (H & E staining, $\times 200$).

Fig. 2. Histological image from the molar, whose pulp was exposed after 4 days. Necrosis was observed in the upper part of the pulpal tissue and the infiltration of the inflammatory cells were extended through the entire pulpal tissue (H & E staining, $\times 100$).

Fig. 3. Histological image from the molar, whose pulp was exposed after 7 days. More advanced pulpitis was observed compared to that of 4 days after pulpal exposure. The pulpal necrosis extended toward the apex (H & E staining, $\times 200$).

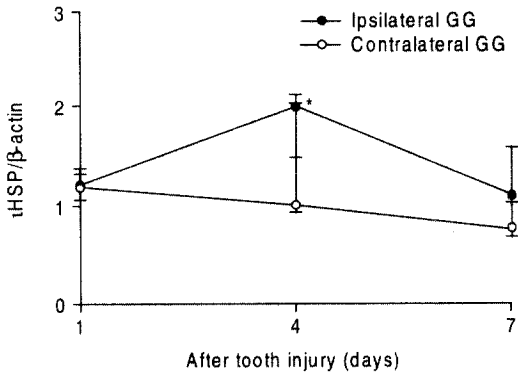


Fig. 4. Inducible heat shock protein 70 levels (iHSP 70) in the Gasserian ganglion (GG) at 1, 4, and 7 days after pulp exposure (*P < 0.05 compared to contralateral side).

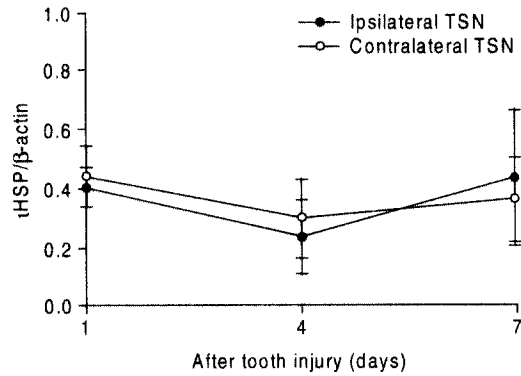


Fig. 5. Inducible heat shock protein 70 (iHSP70) levels in the Trigeminal sensory nucleus (TSN) at 1, 4, and 7 days after pulp exposure. There were no significant changes in the expression of iHSP70 (P > 0.05).

밀도계측 분석으로 측정된 iHSP70 band는 내부 기준인 β-actin에 대하여 표준화하였다. 치수노출이 시간 경과에 따라 GG와 TSN에서 iHSP70 발현에 미치는 영향은 치수노출 4일 후에 동측 GG에서 반대측 GG 보다 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 4, P < 0.05). 그러나, 치수노출 4일 후 동측 TSN에서는 반대측 TSN에 비하여 유의한 변화 소견이 관찰되지 않았고, 치수노출 1일 후나 7일 후에는 GG 및 TSN 모두에서 유의한 iHSP70 발현의 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 5, P > 0.05).

고 찰

HSP는 스트레스에 의해 유도되는 유도열충격단백질(inducible heat shock protein, iHSP)과 스트레스 자극과는 상관없이 세포 내에 일정량 발현되는 cognate heat shock protein (HSC)으로 구분된다. 일반적으로, cHSP는 대사과정에서 housekeeping 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 즉 새로 합성된 polypeptide의 형태와 단백질 막간이동 및 단백질 분해를 돕는다. 또한 세포 내 소포의 통행과 신호전달에 관여하며, 세포사멸(apoptosis) 과정과 세포 주기의 진행에 관련된다.⁸⁾

iHSP70는 molecular chaperone으로서 세포를 보호하는 기능을 가지며, 열내성 및 여러 형태의 스트레스 자극에 대한 세포 수준에서의 내성 및

저항 획득에 관여한다. 한편, 구치의 치수노출에 이은 구강 내 환경으로부터의 세균 감염에 의한 치수염증을 유도하였는데, 이러한 방법은 많은 연구가들에 의해 기술된 바 있다.^{9,12)}

본 실험에서는 치수 손상 4일 후에 동측의 GG에서 반대측에 비하여 유의한 iHSP70의 발현이 관찰되었다. 이러한 소견은 염증이 가장 심했던 치수노출 7일 후에 iHSP70의 발현에 유의한 차이가 없었음을 고려할 때, 염증의 정도보다는 치수 내의 압력이 극대화되고 이로 인한 치통 자극이 중요한 iHSP70 유도 자극이었을 것으로 생각된다. 즉, 치수 노출 4일 후 실험동물의 동측 GG에서 iHSP70의 발현은 우선 염증자극에 의한 스트레스에 기인한 것으로 생각할 수 있다. 그러나, 실험동물의 구치부 치수의 조직 표본에서 염증의 정도를 비교하면 치수손상 4일 후 보다는 7일 후에 더 심하였지만, 반대측 GG와 비교하여 동측 GG에서 iHSP70의 발현에는 유의한 차이가 관찰되지 않았고, 발현 수준도 치수 노출 1일 후와 비교하여서도 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 소견은 치수 손상 후 4일에 전체 치수조직에서 염증이 관찰되었고 시간이 흐름에 따라 염증이 치근단 부위로 확산된 조직학적 소견을 반영할 때, 치근단이 침범되어 치수 내 압력이 감소하는 치수손상 7일 후 보다는 치수손상 4일 후가 치수관 내의 압력이 염증에 따른 삼출에 의하여 가장 높고, 결과적으로 염증상태의 치수조직으로부터의 침해수용성 신경

전달이 가장 많았다고 생각된다.

그리고, iHSP70이 스트레스성 자극에는 비특이적으로 발현되는 점을 생각할 때, 마취나 치과시술과 같은 스트레스는 치수노출 1일 후에 반대측에 비하여 동측에, 또한 다른 시기들의 iHSP70 발현량에 유의한 차이가 없었으므로 이러한 스트레스에 의한 iHSP70의 발현은 배제될 수 있겠다.

치아손상 1, 4, 및 7일 후에 동측 TSN과 반대측 TSN간 iHSP70 level의 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다. 이러한 소견은 치수에 있는 신경말단으로부터의 침해수용성 신경전달에 의해 신경세포체에서 iHSP70가 발현될 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 치수 노출에 의해 신경말단이 손상받을 수 있으므로 일차 구심성 신경 손상에 의해서 iHSP70가 유도될 수도 있겠다.

한편, 스트레스 단백질이 치수조직뿐만 아니라 신경손상에 대한 치유반응을 조절한다는 가설을 뒷받침하는 증거가 있다. 몇 개의 연구단체가 신경계 손상의 몇 가지 다른 모형에서 iHSP70의 과생산이 세포사멸에 방어작용을 함을 밝혀내었다.¹³⁻¹⁵⁾ 그러나 스트레스 단백질이 세포 생존과는 무관한 부현상일 뿐일 수도 있기 때문에 이러한 단백질의 세포 내 기능은 아직까지도 규명되지 않았다.¹⁶⁾

한편, 치수에서의 iHSP70 발현은 치수로부터 조직을 추출하는 데 기술적인 어려움이 있어 조사할 수 없었다. 아마도 치수에서의 iHSP70 발현은 증가하였을 것이라고 생각한다. 치수손상에 대한 신경단백질(neuropeptide) 반응에 관한 대부분의 연구들이 면역반응성 calcitonin gene-related peptide에 초점을 두고 있고, 동물이나 사람으로부터 추출한 염증 상태의 치수에서 이러한 신경단백질이 매우 증가하였음을 보고하였다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 염증 중에 치수 내 신경단백질의 양이 증가함은 조직손상에 반응하는 말초 신경계의 기능적인 적응성을 시사한다.

결론적으로 이 연구의 목적은 백서에서 치수염증에 의한 감각신경 주행로 내 신경계에서의 iHSP70의 발현을 연구하는 것이었다. 가장 치통이 심할 것으로 생각되는 치수노출 후 4일째는 동측 GG에서 iHSP70의 발현이 유의하게 증가되어, 말초신경을 통한 침해수용성 신경전달에 의한 일차 뉴런인 GG에서 iHSP 70을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Moseley P: Heat shock proteins: a broader perspective. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 233-4.
2. Kiang JG, Tsokos GC: Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 1998; 80: 183-201.
3. Sharp FR, Massa SM, Swanson RA: Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci* 1999; 22: 97-9.
4. Mestrlil R, Chi SH, Sayen MR, Dillmann WH: Isolation of novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischemia/hypoxia and heat shock. *Biochem J* 1994; 298: 561-9.
5. Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, et al: Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 1998; 44: 584-91.
6. Ohtsuka K, Suzuki T: Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res Bull* 2000; 53: 141-6.
7. Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (editorial). *Pain* 1983; 16: 109-10.
8. Mayer MP, Bukau B: Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *J Biol Chem* 1998; 379: 261-8.
9. Tagger M, Massler M: Periapical tissue reactions after pulp exposure in rat molars. *Oral Surg* 1975; 39: 304-17.
10. Khayat BG, Byers MR, Taylor PE, Mecifi K, Kimberly CL: Responses of nerve fibers to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by calcitonin gene-related peptide immunocytochemistry. *J Endodon* 1988; 14: 577-87.
11. Stashenko P, Yu SM: T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 1989; 68: 830-4.
12. Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y: Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *J Endodon* 1994; 20: 13-7.
13. Marber MS, Mestrlil R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH, et al: Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995; 95: 1446-56.
14. Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE,

- Kazlaris H, Kollias G, et al: Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest* 1995; 95: 1854-60.
15. Radford NB, Fina M, Benjamin II, Moreadith RW, Graves KH, Zhao P, et al: Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2339-42.
16. Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK: The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol Med Today* 1999; 5: 525-31.
17. Byers M, Taylor P, Khayat B, Kimberly C: Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *J Endodon* 1990; 16: 78-84.
18. Grutzner E, Garry M, Hargreaves KM: Effect of injury on pulpal levels of immunoreactive substance P and CGRP. *J Endodon* 1992; 18: 553-7.
19. Kanning H, Carnes D: Concentration of CGRP in symptomatic and asymptomatic human pulp tissue. *J Endodon* 1993; 19: 191.
-