

# 흰쥐의 치아 맹출과 치간 이개 과정에서 수종의 치주인대 단백질 발현의 변화에 관한 면역 조직화학적 연구

임성훈<sup>1)</sup> · 박형수<sup>2)</sup> · 윤영주<sup>3)</sup> · 김광원<sup>4)</sup> · 김홍중<sup>5)</sup> · 정문진<sup>6)</sup> · 박주철<sup>7)</sup>

치아의 맹출 과정과 치간이개로 유도된 치아 및 치조골의 흡수 과정에서 치주인대 세포와 치주인대 단백질의 기능을 알아보기 위하여, 발육 중인 흰쥐를 치근 형성 전, 치근 형성 시작과 치근 형성 및 맹출 시기로 구분하여 조직 표본을 제작하고, 또한 성장 중인 흰쥐를 2주간 치간 이개시켜 조직표본을 제작하였다. 치주인대 섬유모세포에서 특이적으로 발현되며 치주인대의 분화와 성숙에 관여하는 PDLS22 단백질과 치아와 치조골의 파괴와 흡수를 조절하는 것으로 알려진 RANKL과 OPG의 발현을 면역 조직화학적으로 연구하였다.

PDLS22 단백질은 치근 형성이 시작되면서부터 치낭세포와 끌모세포에서 발현되어, 치아가 맹출하는 과정에서도 그 발현이 계속 유지되었으나, 치간이개에 의하여 치주인대가 개조되는 부위에서는 발현이 감소하였다. RANKL은 치근 형성 과정에서는 미약한 발현을 나타내었으나, 치아가 맹출하면서 발현이 증대되었으며, 치간이개에 의한 치근과 치조골 흡수과정에서는 치주인대세포, 끌모세포, 치수세포 및 파치세포에서 발현이 증대되었다. OPG는 치근이 형성되는 시기에는 강한 발현을 보였으나, 치아가 맹출하면서 발현이 현저히 감소하였고, 치아와 치조골의 흡수가 진행됨에 따라 발현이 다소 감소하였다.

( 주요 단어 : 치주인대, 치간이개, PDLS22, RANKL, OPG )

## I. 서 론

<sup>1)</sup> 조선대학교 치과대학 교정학교실, 전임강사.

<sup>2)</sup> 조선대학교 치과대학 교정학교실, 대학원생.

<sup>3)</sup> 조선대학교 치과대학 교정학교실, 부교수.

<sup>4)</sup> 조선대학교 치과대학 교정학교실, 교수.

<sup>5)</sup> 조선대학교 치과대학 구강해부학교실, 부교수.

<sup>6)</sup> 조선대학교 치과대학 구강조직학교실, 전임강사.

<sup>7)</sup> 조선대학교 치과대학 구강조직학교실, 부교수.

교신저자 : 박주철

광주광역시 동구 서석동 375

조선대학교 치과대학 구강조직학교실 / 062-230-6874

jcapark@mail.chosun.ac.kr

\* 본연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(03-PJI-PGI-CH08-0001)

원고접수일 : 2003년 6월 26일 / 심사통과일 : 2003년 9월 1일

치주인대는 치아 발생과정에서 치낭(tooth follicle)에서 유래하여 치아와 치조골 사이에 위치한다. 치주인대는 치아를 악골에 부착, 지지하고 저작력과 같은 다양한 방향의 기계적 스트레스(mechanical stress)에 저항하며 또한 감각기능을 수행하는 고도로 분화된 세포성 결합조직이다. 치주인대는 치아 발생단계에서부터 주위 치조골의 끌모세포와 함께 치아의 맹출 과정에 관여하고 교정적 치아이동 등에 의하여 유발된 치조골의 흡수 과정에서도 다양한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다<sup>1,2)</sup>.

치아의 맹출을 일으키는 힘은 일차적으로 치주인

대의 섬유모세포에 의하여 유발되나 이차적으로 주위 치조골의 골 개조를 수반하여야만 치아의 맹출이 진행된다. 이런 이유로 최근에는 맹출과 관련한 골 개조를 조절하는 세포 환경과 관련 인자들에 대한 관심이 높아지고 있다<sup>3)</sup>. 치주인대가 존재하지 않는 유착치아(ankylosed teeth)에서는 교정적 치아이동을 유도할 수 없다는 사실에서도 알 수 있듯이 치아이동이나 치조골 흡수 과정에서 치주인대 세포들이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다<sup>4-7)</sup>. 그러나 치아 맹출과 치주인대의 개조 그리고 치조골의 흡수가 일어날 때 치주인대 내 세포들에서 일어나는 치주인대 고유 특성의 변화나 치조골 흡수를 설명하는 생물학적 기전에 관해서는 아직까지 명확히 알려져 있지 않다.

PDLs22 단백질은 최근에 Park 등<sup>8,9)</sup>에 의하여 배양 치은 섬유모세포(cultured gingival fibroblast)와 비교하여 치주인대 섬유모세포(periodontal ligament fibroblast)에서 특이적으로 발현되는 단백질로 처음 발견되었다. 이는 치주인대의 재생과 분화에 관여하며 치주인대의 고유한 표현형을 유지하는 데에도 필요한 단백질이지만, 치조골을 형성하는 골모세포에서도 일부 합성되는 물질로 보고되었다<sup>10)</sup>. RANKL (receptor activator of nuclearfactor kappa B ligand)은 ODF (osteoclast differentiation factor)나 OPGL (osteoprotegerin ligand) 또는 TRANCE(tumor necrosis factor-related activation induced cytokine)로도 알려져 있는데 임파조직과 T임파구 세포주에서 최초로 발견되었으나, 최근에는 성숙한 골모세포와 골수의 간질세포에서 분비되어 파골세포와의 세포간 결합을 통하여 파골세포의 형성을 촉진하는 인자로 알려지고 있다<sup>11-13)</sup>. OPG(osteoprotegerin)는 OCIF (osteoclastogenesis inhibitory factor)나 RANKL의 분비 수용체로도 알려져 있으며 RANKL의 기능을 억제하는 미끼 수용체(decoy receptor)의 역할을 통하여 파골세포의 형성을 억제하는 인자로 알려져 있다<sup>14-16)</sup>.

본 연구에서는 치아 맹출과 과도한 치간 이개를 통하여 유도된 치주인대 개조와 치조골 흡수 상태에서 치주인대의 특성 변화와 골의 흡수를 조절하는 인자들과 치주인대 세포와의 연관성을 알아보기 위하여, 치근 형성 전과 치근 형성 그리고 치아가 맹출하는 시기의 흰쥐 하악 제1대구치 표본과 2주간 활동 와이어(brass wire)에 의하여 과도하게 치간이개를 유도한 조직표본에서 치주인대에서 특이적으로 발현되는 PDLs22 단백질과 파골세포의 활성 조절에 관여하는

것으로 알려진 RANKL 그리고 OPG 항체를 이용하여 면역조직화학적으로 연구하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 실험동물

흰쥐 하악 제1대구치의 치근 형성과 치아 맹출과정에서 치주인대 단백질의 발현을 확인하기 위하여 생후 21일 5마리, 생후 27일 5마리와 생후 34일 5마리의 흰쥐를 실험에 이용하였다.

치간 이개 후 조직 변화를 관찰하기 위하여 출생 6주령의 흰쥐 10마리를 에테르 흡입 마취 후 하악 제1대구치와 제2대구치의 사이에 직경 0.6mm의 활동 와이어(Messing-Drht, Dentaurum®, Germany)를 이용하여 2주일 동안 치아를 이개시켰다.

### 2. 조직 표본 제작

발육과정의 흰쥐와 치간 이개시킨 흰쥐의 하악골을 적출하여 4% paraformaldehyde 용액에 4°C에서 24시간 고정한 후, PBS(phosphate buffered saline)용액으로 2시간 세척하고 10% EDTA 용액에 4°C에서 2~4주간 탈회하였다. 탈회를 확인한 다음, 통법에 따라 탈수하고 포매한 다음 6μm 두께로 박절하였다. 일부는 hematoxylin-eosin 염색을 시행하고 나머지는 면역조직화학적 염색 때까지 4°C에 보관하였다.

### 3. 면역조직화학적 염색

면역조직화학적 염색을 위한 일차항체로는 anti-PDLs22 다클론성 항체와 anti-RANKL 단클론성 항체 그리고 anti-OPG 단클론성 항체를 사용하였다. Anti-PDLs22 다클론성 항체는 박 등<sup>10)</sup>의 방법에 의하여 제작하였으며, anti-RANKL 단클론성 항체와 anti-OPG 단클론성 항체는 조선대학교 치과대학 구강미생물학교실에서 제작한 항체를 이용하였다.

4°C에 보관된 절편을 xylene으로 탈 파라핀 처리하고 0.1M PBS로 두 차례 세척하고, 0.3% 과산화수소(H2O2)가 포함된 완충액(Methanol 40ml + 30% H2O2 0.4ml)에서 20-30분 동안 endogenous peroxidase block 처리한 후 다시 PBS로 세 차례 더 세척하였다. 이 절편을 0.5% BSA(Bovine Serum Albumin)가 함유된 PBS 용액을 사용하여 회석된 정상 혈청으

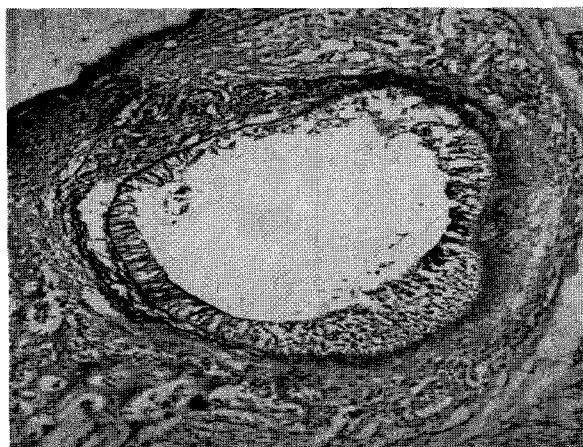


Fig. 1. An immunohistochemical representation of PDLS22 at the pre-root formation stage of tooth development in mandibular first molar of rat. PDLS22 is expressed in tooth follicle. Fo: tooth follicle,  $\times 40$ .

로 20분 동안 예비 항온 처리하고, 정상 혈청을 이용하여 희석한 1차 항체 (anti-PDLS22 항체; 1:100, anti-RANKL 항체; 1:50, anti-OPG 항체; 1:50)로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 반응시켰다. PBS로 세척한 후, 절편을 2차 항체로서 0.5% BSA를 포함한 PBS로 희석(1drop/ 0.5% BSA sol 10ml)한 염소 항토끼 IgG와 IgM 항체와 실온에서 1시간 동안 항온 처리하였다. PBS로 20분 동안 세척한 후, ABC 시약(Avidine-biotin-peroxidase complex, Vector Lab, USA)과 45분 동안 반응시키고 PBS로 20분 동안 세척한 후 0.05% DAB (Diaminobenzidine Tetrahydrochloride)를 이용하여 발색시킨 후, 절편을 세척하고 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### III. 결 과

#### 1. 치근 형성과 치아 맹출 과정에서 치주인대 단백질의 발현.

치아 발생과정에서 하악 제1대구치의 치근이 형성되기 전 단계인 생후 21일의 조직 표본에서 PDLS 22 단백질은 치배를 둘러싸고 있는 치낭의 세포에서 강하게 발현되었으나, RANKL과 OPG는 미약한 발현을 보였다(Fig. 1). 초기 치근 형성 단계인 생후 27 일 흰쥐의 조직표본에서는 PDLS22와 OPG가 발생 중인 치배주위의 치낭세포와 일부 치주인대세포에



Fig. 2. An immunohistochemical representation of RANKL at the early root development in mandibular first molar of rat. Expression of RANKL is barely detected in tooth follicle and periodontal ligament (arrows),  $\times 100$ .



Fig. 3. An immunohistochemical representation of OPG at the early root development in mandibular first molar of rat. OPG is strongly expressed in tooth follicle and periodontal ligament (arrows),  $\times 100$ .

서 강하게 발현되었으나 RANKL의 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 2, 3). 치근 형성과 더불어 치아맹출이 진행되는 시기인 생후 34일의 하악 제1대구치 조



Fig. 4. An immunohistochemical representation of PDLS22 at the advanced root formation and active eruption stage of tooth development in mandibular first molar of rat. PDLS22 is expressed in tooth follicle and osteoblasts. AB: alveolar bone, Fo: tooth follicle, Am: ameloblast, De: dentin,  $\times 200$ .

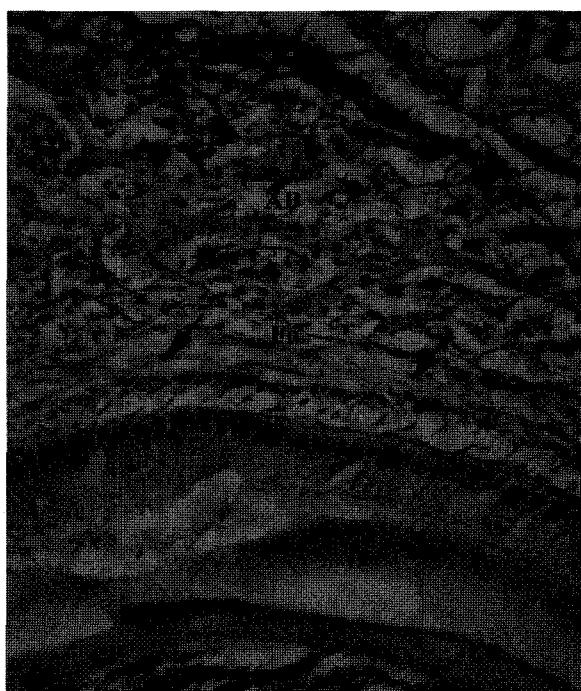


Fig. 6. An immunohistochemical representation of OPG at the advanced root formation and active eruption stage of tooth development in mandibular first molar of rat. OPG is not expressed in tooth follicle (arrows) and the other areas. AB: alveolar bone, Fo: tooth follicle, Am: ameloblast, De: dentin,  $\times 200$ .

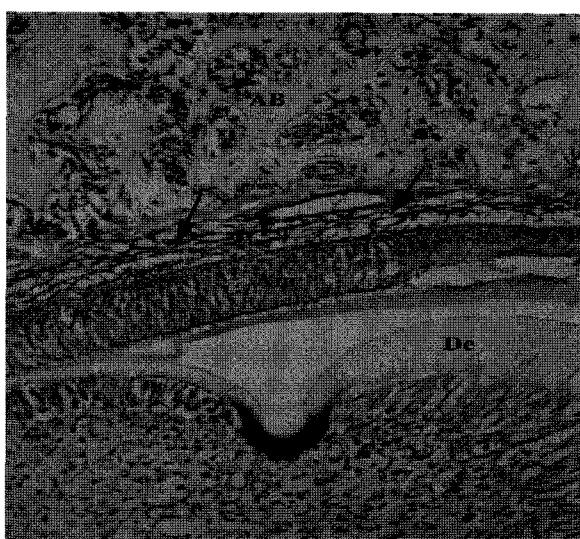


Fig. 5. An immunohistochemical representation of RANKL at the advanced root formation and active eruption stage of tooth development in mandibular first molar of rat. RANKL is expressed in osteoblasts, tooth follicle (arrows), ameloblasts, odontoblasts and pulpal fibroblasts. AB: alveolar bone, Fo: tooth follicle, Am: ameloblast, De: dentin,  $\times 200$ .

직표본에서 PDLS22 단백질은 치낭의 세포와 주위 치조골의 골모세포에서 강한 발현을 보였으며(Fig. 4), RANKL은 치낭세포와 치조골의 골모세포에서 강하게 발현되었고 하부의 법랑모세포와 상아모세포 그리고 치수 섬유모세포에서도 발현이 관찰되었으나 (Fig. 5), OPG는 일부 골모세포의 미약한 발현을 제외하고 다른 세포들에서는 발현되지 않았다 (Fig. 6).

## 2. 치간 이개 과정에서 치주인대 단백질의 발현

정상 흰쥐의 H-E 염색 표본에서 제1대구치와 제2대구치 사이의 치간 중격(interdental septum)은 치아의 백악법랑경계와 거의 동일한 높이로 위치해 있었으며 수평으로 주행하는 경중격인대(transseptal ligament)도 잘 관찰되었다. 치주인대와 접한 치조골과 치근에서 골과 치근의 흡수나 파골세포는 거의 관찰되지 않았다(Fig 7, 8). 치간 이개를 시행한 군의 H-E



Fig. 7. A histological section taken from lower first and second molar of normal animals. Osteoclastic activity is not observed in the alveolar bone and the tooth. AB: alveolar bone, De: dentin. H-E stain,  $\times 40$ .)

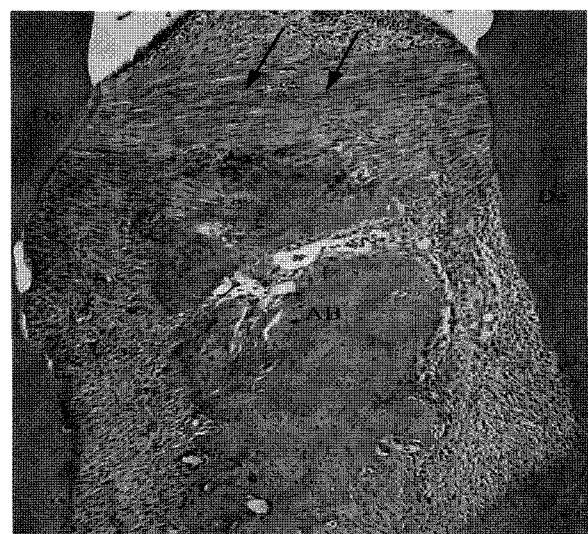


Fig. 8. A histological section taken from lower first and second molar of normal animals. Note the trans-septal ligament (arrows) between lower first molar and second molar. AB: alveolar bone, De: dentin. H-E stain,  $\times 100$ .

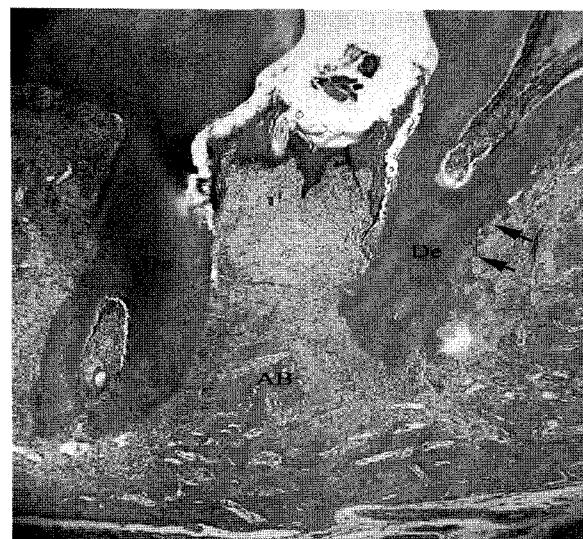


Fig. 9. A histological section taken from lower first and second molar 2 weeks after interdental separation. Note the alveolar bone resorption and undermining root resorption (arrows) in this section. AB: alveolar bone, De: dentin. H-E stain,  $\times 40$ .



Fig. 10. A histological section taken from interdental septum between lower first and second molar 2 weeks after interdental separation. Note that hyalinized tissues appear as empty space near the root surface in the periodontal ligament and also PDL remodeling in the middle of periodontal ligament (arrows),  $\times 100$ .

염색 표본에서는 치간 중격이 치근침 부위와 같은 높이까지 낮아져 있었으며 경중격 인대도 소실되었고 치주인대가 개조와 더불어 좌우측으로 신장된 양상

을 보였다. 치조골에서는 여러 개의 핵을 가지면서 Howship's 소와에 위치한 파골세포들에 의한 골의 흡수 양상을 쉽게 관찰할 수 있었으며 치근면에서는



Fig. 11. A histological section taken from resorbing alveolar bone septum between lower first and second molar 2 weeks after interdental separation. There are many osteoclasts(arrows) resorbing alveolar bone,  $\times 200$ .

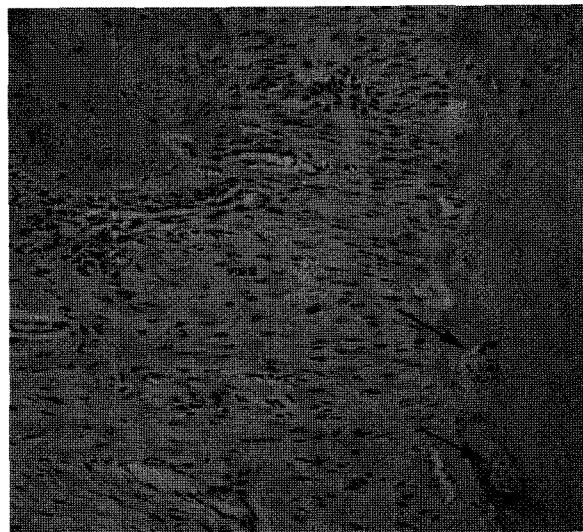


Fig. 12. A histological section taken from lower first molar root 2 weeks after interdental separation. Note the undermining resorption (arrows) by odontoclasts in the tooth root,  $\times 200$ .

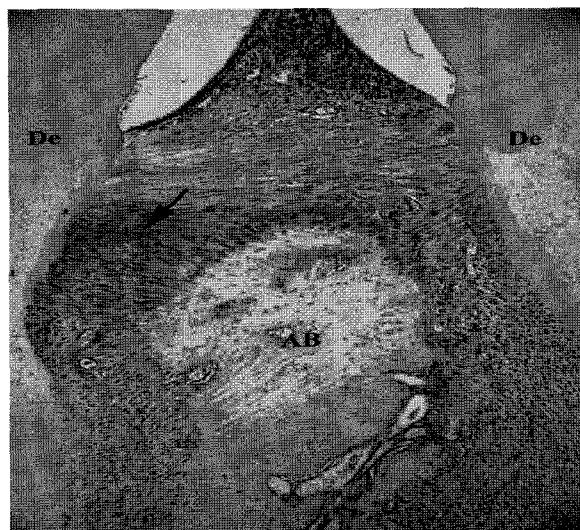


Fig. 13. An immunohistochemical representation of PDLs22 in periotontium between lower first and second molar of normal animals. PDLs22 is expressed strongly in osteoblasts and PDL fibroblast (arrows). AB: alveolar bone, De: dentin,  $\times 100$ .

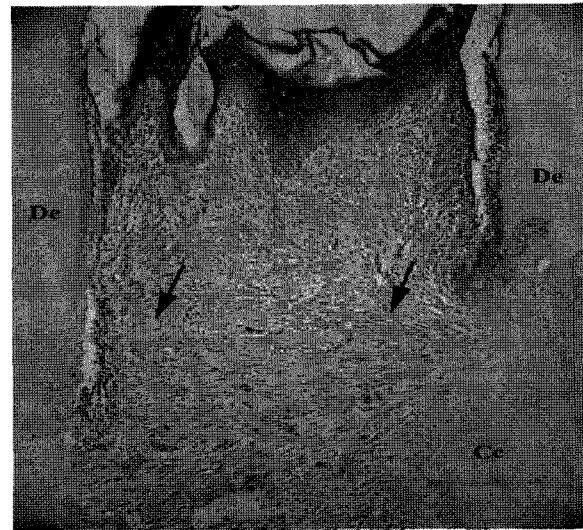


Fig. 14. An immunohistochemical representation of PDLs22 in periotontium between lower first and second molar 2 weeks after interdental separation. Expression of PDLs22 is decreased with interdental separation (arrows),  $\times 100$ .

파치세포에 의한 상아질의 이면 흡수(undermining resorption)도 나타났다(Fig. 9, 10, 11, 12).

PDLs22 단백질은 치간 이개를 시행하지 않은 군에

서는 치주인대와 치조골의 골모세포에서 강한 발현을 보였으나 치간 이개 과정에 따라서 그 발현이 감소되는 양상을 나타냈다(Fig. 13, 14). RANKL은 치

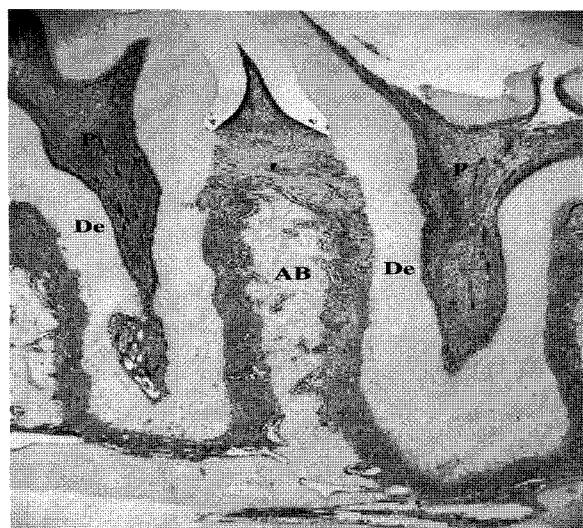


Fig. 15. An immunohistochemical representation of RANKL in lower first and second molar of normal animals. RANKL is expressed in odontoblasts, pulp fibroblasts, spindle-shaped mesenchymal cells around the blood vessel, lumen of the blood vessel, PDL fibroblasts and osteoblasts,  $\times 40$ .



Fig. 16. An immunohistochemical representation of RANKL in lower first and second molar of 2 weeks after interdental separation. RANKL is expressed in odontoblasts, pulp fibroblasts, spindle-shaped mesenchymal cells around the blood vessel, lumen of the blood vessel, resorbing dentin and cementum matrix, PDL fibroblasts, osteoblasts and osteoclasts. Expression of RANKL is increased with resorption of alveolar bone and tooth,  $\times 40$ .

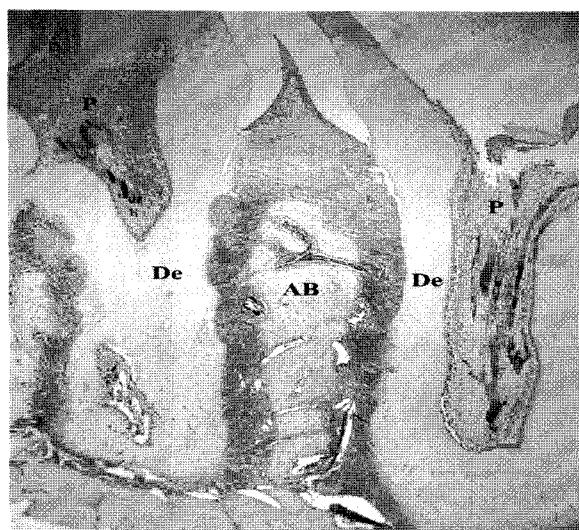


Fig. 17. An immunohistochemical representation of OPG in lower first and second molar of normal animals. OPG is expressed in odontoblasts, pulp fibroblasts, spindle-shaped mesenchymal cells around the blood vessel, lumen of the blood vessel, PDL fibroblasts and osteoblasts,  $\times 40$ .

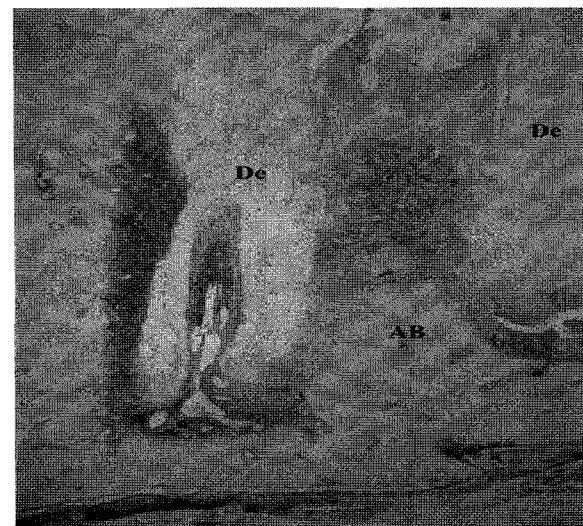


Fig. 18. An immunohistochemical representation of OPG in lower first and second molar 2 weeks after interdental separation. OPG is expressed in pulp fibroblasts, lumen of the blood vessel, PDL fibroblasts and osteoblasts. Expression of OPG is decreased with resorption of alveolar bone and tooth,  $\times 40$ .

간 이개를 시행하지 않은 군과 치간 이개한 군의 치수 섬유모세포, 상아모세포, 혈관의 주위세포와 내강, 치주인대 섬유모세포, 골모세포와 일부의 골세포, 과

골세포와 파치세포 및 흡수가 진행되는 상아질과 백악질의 기질에서 발현되었다. 치간 이개 과정에서 치주인대 폭경이 넓어지고 치조골과 치근의 흡수가 진행됨에 따라 치간 이개를 시행하지 않은 군에 비하여 치간 이개 표본에서 RANKL의 발현이 더욱 강하고 광범위하였다(Fig. 15, 16). OPG는 치간 이개를 시행하지 않은 군과 치간 이개한 군의 치수 섬유모세포, 상아모세포, 혈관의 내강, 골모세포 및 치주인대 섬유모세포에서 발현되었다. 그러나, 치간 이개 과정에 따라 골과 치근의 흡수가 일어나면서 OPG의 발현이 치간 이개를 시행하지 않은 군에 비하여 치간 이개 표본에서 감소하는 소견을 보였다 (Fig. 17, 18).

#### IV. 총괄 및 고안

치주인대의 발생과 분화 그리고 특성 유지에 관여하는 인자들에 관한 연구에서, 초기에는 치주인대를 형태학적으로 관찰하여 기능적 특성을 이해하려는 연구들이 행해져 왔고, 다음으로는 치주인대 세포의 상피성장인자 결합부(epidermal growth factor binding site), 치주인대세포의 제XII형 교원질과 S100 칼슘결합 단백체(S100 calcium-binding protein family) 그리고 치주인대세포의 osteoclast specific factor-2(OSF-2, periostin)에 관한 연구들<sup>17)</sup>이 행해져 왔다. 그러나 이러한 연구 결과들은 주로 치주인대 섬유모세포의 특성 유지나 분화 과정에 직접 관련된 연구 결과라기 보다는 치주인대의 석회화를 방지하거나 치주인대의 백악모세포나 골모세포의 특성이나 분화에 관련되는 것들이었다.

최근에 발견된 PDLS22는 노던분석(Northeren blot analysis)과 mRNA 인사이투하이브리드(mRNA in situ hybridization), 그리고 면역조직화학적 염색에서 신체의 다른 조직에서는 발현되지 않으나 치주인대 섬유모세포에서 특이적으로 발현되며, 세포 배양 실험에서 치주인대세포 발생 초기부터 분화-성숙 시기까지 그 발현이 유지되는 것으로 보고되었다. 이 결과로 볼 때 PDLS22 단백질이 발현된다는 것은 치주인대 세포의 특성과 고유한 표현형이 유지되고 있는 상태라고 볼 수 있다<sup>10)</sup>. 본 실험에서 PDLS22는 치근 형성전의 치낭세포에서부터 발현되어 치아가 맹출하여 치주인대가 정상적으로 기능할 때까지 유지되다가 치간 이개를 통하여 치주인대에 비정상적인 장력이 작용하여 치주인대의 개조가 일어난 시기에는 그 발현이 다소 감소하였다(Fig 1, 4, 13, 14). 이 결과는 치주인대는 일시

적으로 개조되는 시기를 제외하고는 발생과정에서부터 치조골 흡수에 이르는 환경에서까지 그 독특한 특성과 표현형을 유지한다고 해석할 수 있으나, 치주인대의 개조가 일어날 때 PDLS 22의 발현이 감소하는 원인 요소에 관해서는 보완 연구가 필요하다.

RANKL은 과골세포의 형성을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있는데, 골모세포 이외에도 골막의 간엽세포, 장골의 비대 연골, 뇌, 심장, 신장, 골격근 및 피부와 같은 다양한 조직에도 분포하며 이 물질을 처리하면 과골세포의 골흡수와 액틴(actin) 고리 형성 그리고 세포질의 퍼짐 현상에까지 영향을 끼치는 것으로 알려지고 있다<sup>18,19)</sup>. Losssdorfer 등<sup>20)</sup>은 RANKL은 골모세포와 골수의 간질 세포뿐만 아니라, 과치세포와 흡수 중인 상아질과 백악질의 기질과 반전선에서도 발현된다고 하였으며, Rani와 MacDogall<sup>21)</sup>은 처음으로 RANKL이 골모세포가 아닌 상아질을 형성하는 상아모세포와 치수 내의 섬유모세포에서도 발현된다고 하였고, Kawamoto 등<sup>22)</sup>은 RANKL이 치주인대의 골 인접부의 간엽세포와 혈관 주위의 방추형의 세포에서도 발현된다고 하여 RANKL의 조직 내에서의 다양한 역할을 암시하였다. 본 실험에서 RANKL은 치근 형성 전과 치근 형성 시기의 치낭세포에서는 미약한 발현이 관찰되다가 치아가 맹출하는 시기에 그 발현이 증가하는 소견을 보였는데 이는 치아가 맹출하는 시기에 치조골의 형성과 개조에 수반하여 과골세포의 활동이 증가하기 때문인 것으로 생각된다 (Fig 2, 5). 또한 이 소견은 치낭세포가 RANKL을 분비하며 RANKL이 없으면 치아맹출이 진행되지 않는다고 보고한 Kong 등<sup>16)</sup>의 연구 결과와 일치한다.

OPG는 RANKL과 직접 결합하여 결과적으로 과골세포의 형성을 억제하는 기능을 하는 것으로 알려져 있는데<sup>23,24)</sup>, Oshiro 등<sup>25)</sup>은 OPG-deficient 생쥐를 이용한 연구에서 OPG가 없으면 상대적으로 RANKL의 활성이 증대되어 교정적 치아이동이 일어날 때 치조골의 흡수가 훨씬 더 심하게 나타난다고 하였으며, Shotani 등<sup>26)</sup>은 OPG가 과골세포의 흡수 주름 형성을 억제하고 세포 사멸화(apoptosis) 현상을 촉진하여 결과적으로 골의 흡수 능력을 저하시킨다고 하였다. 본 연구에서 OPG는 치근이 형성되는 시기에는 치낭과 치주인대에 강하게 발현되다가 치아가 맹출하면서 치낭세포 뿐만 아니라 주위 골모세포에서도 그 발현을 관찰 할 수 없었는데, 이 결과는 치아 맹출 과정에 과골세포의 활성을 저하시키면 맹출이 지연되는 것과 같은 장애가 초래될 수 있기 때문이라고 생각되며, 이

는 또한 치낭세포나 치주인대세포는 정상적으로 OPG를 분비하나 치아맹출 과정에서는 분비가 현저히 저하된다는 Wise 등<sup>27,28)</sup>의 연구 결과와도 부합한다.

본 실험에서 치관 형성에서 치아 맹출까지 치주인대 단백질들의 순차적인 발현을 관찰하기 위하여 하악 제1대구치의 치근 형성 전 치관 형성 단계인 생후 21일과 치근 형성단계인 생후 27일 그리고 치근 형성 및 치아 맹출 단계인 생후 34일의 흰쥐를 이용하였다<sup>29)</sup>. 또한, 치주인대의 개조와 치조골 흡수를 유도하기 위하여 치간 이개를 시행하였는데 0.6mm 황동 와이어를 이용하여 2주간 치간 이개한 것은 치주인대와 치근 그리고 치조골에 과도한 힘이 전달되게 하여 실험 목적에 부합되게 치주인대의 변화와 치근과 치조골의 명확한 흡수를 유도하고자 하였다. H-E 염색을 통한 형태학적 관찰에서 치간 이개를 통하여 치주인대가 개조와 더불어 좌·우측으로 신장된 양상을 보였고 치간 중격이 과도하게 흡수되었으며, 치조골에서의 파골세포들에 의한 골의 흡수 양상과 치근면에서의 파치세포에 의한 상아질의 이면 흡수가 나타났다(Fig 7, 8, 9, 10, 11, 12). 이는 과도한 치간 이개를 통하여 치주인대와 치근 및 치조골의 흡수를 유도한 실험 방법이 적절하였음을 나타낸다.

치간 이개 후 RANKL과 OPG 항체를 이용한 면역조직화학적 염색에서 RANKL은 치수 섬유모세포, 상아모세포, 혈관의 주위세포와 혈관의 내강, 치주인대 섬유모세포, 골모세포와 일부의 골세포, 파골세포와 파치세포 및 흡수가 진행되는 상아질과 백악질의 기질에서 발현되었으며, 치간 이개로 인한 치주인대 폭경 증가와 치조골과 치근의 흡수가 진행됨에 따라 RANKL의 발현이 더욱 강하고 광범위하게 나타났다(Fig 15, 16). 이는 RANKL이 치조골의 흡수를 촉진한다는 다양한 연구 결과와 일치하는 것이나, 본 연구 결과에서 특징적인 것은 치근의 흡수 과정에서 이면 흡수와 외 흡수가 진행되는 상아질과 백악질의 기질에서도 RANKL이 발현되었다는 점으로 과도한 치근 흡수 과정에서 RANKL이 치주인대 섬유모세포나 혈관주위 세포로부터 파치세포로 분화됨을 나타내는 새로운 결과라 할 수 있다.

OPG는 치수 섬유모세포, 상아모세포, 혈관의 내강, 골모세포 및 치주인대 섬유모세포에서 발현되었으며 (Fig 17, 18), 치간 이개 과정에 따라 OPG의 발현이 치근과 치조골에 인접한 면에서 감소하는 결과가 나타났는데 이는 파골세포가 활동하는, 흡수가 진행되는 부위에서는 OPG의 분비가 억제되고 RANKL의

활성이 증가된다는 것을 나타낸다.

연구 결과를 종합하여 보면 RANKL과 OPG는 치아 발생 단계의 치근 형성 시기에서부터 발현되어, 치조골의 개조나 치근 흡수가 진행되는 치아 맹출과 치간 이개 과정에서는 RANKL의 발현이 증가하고, 치주인대와 치근 그리고 치조골이 정상적으로 유지되는 환경에서는 OPG의 발현이 증가하였다. 또한 이런 일련의 과정에서 PDls22의 발현 양상으로 보아 치주인대는 고유의 특성과 표현형을 유지하나 치간 이개에서와 같이 치주인대의 개조가 활발히 일어나는 상황에서는 일시적으로 치주인대 섬유모세포 고유의 특성 변화가 초래되는 것으로 관찰되었다. 앞으로 이번 연구 결과를 토대로 치근 흡수와 연관한 RANKL과 OPG의 역할과 치수내 상아질의 흡수과정에서 상아모세포와 치수섬유모세포의 흡수 조절 그리고 치주인대의 환경 변화에 따른 PDls22의 기능 등에 관한 분자생물학적인 보완 연구를 시행한다면 치아와 치조골의 생리적·병리적 환경에 따른 치주인대세포와 제반 관련 인자들의 상호 작용에 대한 세포생물학적 기전을 이해할 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

치아의 맹출 과정과 치간 이개로 유도된 치아 및 치조골의 흡수 과정에서 치주인대 세포와 치주인대 단백질의 기능을 알아보기 위하여, 치주인대 섬유모세포에서 특이적으로 발현되며 치주인대의 분화와 성숙에 관여하는 PDls22 단백질과 치아와 치조골의 파괴와 흡수를 조절하는 것으로 알려진 RANKL과 OPG의 발현을 면역 조직화학적으로 연구한 결과 치주인대 세포는 치주인대가 활발히 개조되는 시기를 제외하고는 치아 맹출과 치근 그리고 치조골 흡수 과정에서 그 독특한 표현형을 유지하는 것으로 볼 수 있으며, 치주인대와 인접 치주조직을 흡수없이 정상적으로 유지하는 데에는 OPG가 관여하며, 치아와 치조골의 흡수가 활발할 때에는 RANKL의 역할이 증대되는 것으로 나타났다. 그러나 이에 관한 명확한 기전을 규명하기 위해서는 보완 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Duarte WR, Iimura T, Takenaga K, et al. Extracellular role of 100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 : 255 : 416-20.
- Wellington JR, Gregory JK, Gaaman G. Osteoclast recruitment to sites

- of compression in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001; 120: 477-89.
3. Ahlen J, Andersson S, Mukohama H, et al. Characterization of the bone-resorptive effect of interleukin-11 in cultured mouse calvarial bones. *Bone* 2002; 31: 242-51.
  4. Miyoshi K, Igarashi K, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Tooth movement and changes in periodontal tissue in response to orthodontic force in rats vary depending on the time of day the force is applied. *Eur J Orthod* 2001; 23: 329-38.
  5. Oshiro T, Shibasaki Y, Martin J, Sasaki TJ. Immunolocalization of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NF<sub>k</sub>B ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec* 2001; 264: 305-11.
  6. Piyapattamin T, Takano Y, Eto K, Soma K. Morphological changes in periodontal mechanoreceptors of mouse maxillary incisors after the experimental induction of anterior crossbite: a light and electron microscopic observation using immunohistochemistry for PGP 9.5. *Eur J Orthod* 1999; 21: 15-29.
  7. Wu YM, Richard DW, Rowe DJ. Production of matrix-degrading enzymes and inhibition of osteoclast-like cell differentiation by fibroblast-like cells from the periodontal ligament of human primary teeth. *J Dent Res* 1999; 78: 681-9.
  8. 김유배, 김홍중, 김명수, 박주철. Expression of specific gene transcripts in periodontal ligament fibroblast. 대구해부지 1999; 23: 1-13
  9. Park J-C, Kim YB, Kim H-J, et al. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. *Biochem Biophys Res Comm* 2001; 282: 1145-53.
  10. 박중원, 박병기, 김상목, 김병옥, 박주철. 발생증인 생쥐 치아 및 치주조직에서 치주인대-특이 단백질 : PDLS22의 발현. 대치주학지 2002; 32: 1-12.
  11. Faucheu C, Horton MA, Price JS. Nuclear localization of type I parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptors in deer antler osteoclasts: evidence for parathyroid hormone-related protein and receptor activator NF-κappaB-dependent effects on osteoclast formation in regenerating mammalian bone. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 455-64.
  12. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res* 2001; 80: 887-91.
  13. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, et al. Localization of RANKL mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999; 25: 525-34.
  14. Hasegawa T, Kikuiri T, Takeyama S, et al. Human periodontal ligament cell derived from deciduous teeth induce osteoclastogenesis in vitro. *Tissue Cell* 2002; 34: 44-51.
  15. Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, et al. Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor β and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1924-34.
  16. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-23.
  17. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression of periosteum and periodontal ligament increased expression by transforming growth factor β. *J Bone Mineral Res* 1999; 14: 1239-49.
  18. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor κB ligand up-regulation via prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 210-20.
  19. Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Localization of receptor activator of NF<sub>k</sub>B ligand, RANKL, in periodontal tissues during experimental movement of rat molars. *J Electron Microscop* 2001; 50: 365-9.
  20. Losendorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcified Tissue Int* 2002; 1: 45-52.
  21. Rani CS, MacDougall M. Dental cell express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Comm* 2000; 3: 145-52.
  22. Kawamoto S, Ejiri S, Hoshi K, Nagaoka E, Ozawa H. Immunolocalization of osteoclast differentiation factor in rat periodontium. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 55-8.
  23. Kondo H, Guo J, Bringhurst FR. Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase a mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1667-79.
  24. Lee S-K, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor -κB ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. *Bone* 2002; 31: 252-9.
  25. Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. *Anat Rec* 2002; 266: 218-25.
  26. Shiotani A, Takami M, Itoh K, Shibasaki Y, Sasaki T. Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NF<sub>k</sub>B ligand and osteoprotegerin. *Anat Rec* 2002; 268: 137-46.
  27. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 323-34.
  28. Wise GE, Yao S, Zhang Q, Ren Y. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin in vitro by rat dental follicle cells and its implications for tooth eruption. *Arch Oral Biol* 2002; 47(3): 247-254.
  29. MacNeil RL, Berry JE, Strayhorn CL, et al. Expression of type I and XII collagen during development of the periodontal ligament in the mouse. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 779-87.

## - ABSTRACT -

## Immunohistochemical localization of several protein changes in periodontal ligament during tooth eruption and interdental separation of rats

Sung-Hoon Lim<sup>1)</sup>, Hyung-Soo Park<sup>1)</sup>, Young-Jooh Yoon<sup>1)</sup>, Kwang-Won, Kim<sup>1)</sup>,  
Heung-Joong Kim<sup>2)</sup>, Moon-Jin Jeong<sup>3)</sup>, Joo-Cheol Park<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Orthodontics, College of Dentistry, Chosun University

<sup>2)</sup> Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Chosun University

<sup>3)</sup> Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University

In this study, we attempt to investigate the mechanisms by which PDL cells regulate osteoclast formation and also to know whether PDL retained their characteristic phenotype during tooth eruption and interdental separation.

Rats were prepared at developmental days 21 (pre-root formation), 27 (root development), 34 (advanced root formation/eruption) and at later times(adult rats). To induce severe resorption state of alveolar bone and tooth root, interdental separation with brass wire was performed between the lower first and second molars for 2 weeks in adult rats. Rat mandibles were demineralized and embedded in paraffin, and horizontal and frontal section were prepared for immunohistochemical analysis using PDL-specific protein 22 (PDLs22), receptor activator of NFkB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) antibodies.

1. Root formation and eruption stage of tooth development.
  - 1) PDLs22 immunolocalization was observed in tooth follicle/PDL cells and osteoblasts throughout the root formation and eruption stages of tooth development.
  - 2) RANKL expression became stronger at eruption stage than root formation stage of tooth development.
  - 3) Strong expression of OPG was detected in follicle/PDL cells of root formation stage but it was decreased with tooth eruption.
2. Interdental separation between lower first and second molar.
  - 1) Compared to normal animal, multinucleated osteoclasts and odontoclasts were markedly induced in the alveolar bone and tooth root with PDL remodeling in hematoxylin-eosin section.
  - 2) PDLs22 expression was decreased with interdental separation.
  - 3) RANKL expression was increased with interdental separation in PDL fibroblasts, osteoblasts, odontoclasts and its lacunae, resorbing dentin, cementum and bone matrix.
  - 4) OPG expression was slightly decreased in the PDL cells adjacent to the alveolar bone and root surface with interdental separation.

These results suggested that during tooth eruption and tooth movement, RANKL and OPG in the periodontal tissues are important determinants regulating balanced alveolar bone and tooth root resorption. And it is also suggested that PDL cells retained their characteristic phenotype during tooth eruption and interdental separation except for the short period of PDL remodeling.

KOREA. J. ORTHOD. 2004 : 34(1) : 71-81

\* Key words : Periodontal ligament, Interdental separation, PDLs22, RANKL, OPG