

# 발치창 치유과정의 Cyclic Nucleotides와 Alkaline Phosphatase에 관한 연구

서울대학교 대학원 치의학과 구강외과학 전공

(지도 양 동 규 교수)

박 상 균

## — 목 차 —

- I. 서 론
- II. 실험방법
- III. 실험성적
- IV. 고 찰
- V. 총 괄
- 참고문헌
- 영문초록

## I. 서 론

치아의 발거는 여러가지 원인이 있겠으나 교정치료시의 치아의 발거라든가 특수한 경우를 제외하고는 보존치료가 불가능한 경우 행하게 되며 발치창의 치유가 끝나야만 제속적인 치과진료가 가능하다.

발치창의 치유과정은 매우 복잡하여 초기에는 조직분화가 일어나고, 골형성과 석회화가 이루어지는데 이러한 창상치유과정은 많은 요인들에 의해 좌우된다.

발치창치유에 대해서는 많은 조직학적 보고가 있는 바, Huebsch등(1952), Amler등(1960), Boyne(1966), Petrokovski(1967)와 김(1972)은 발치와 조직의 세포분화와 골조직 형성에 대해 보고하였고, Sela와 Jaffe(1977)는 발치와의 치유와 골개조에 대한 전자현미경적 연구를 보고한 바 있다.

골조직형성과 석회화에서의 alkaline phosphatase의 역할에 대해 Gomori(1943), Jeffree(1962), Bernard(1978)가 보고하였고, Magnusson등(1974), Hasselgren등(1978)과 Hasselgren(1978)이 악골과

치아형성시의 alkaline phosphatase의 활성화도에 관해 연구하였으며, Firestone과 Heath(1981)는 배양 세포에서 alkaline phosphatase활성화 유도에 대한 cyclic AMP영향을 보고 하였다.

조직의 분화와 많은 효소들의 작용은 세포내에 존재하는 cyclic nucleotide 특히 Adenosine 3', 5'-Monophosphate(cyclic AMP)와 Guanosine 3', 5'-Monophosphate(cyclic GMP)의 상호작용에 의해 영향을 받고 있다. Davidovitch등(1978)은 섬유원 세포의 증식과 cyclic AMP와 cyclic GMP의 세포내 분포에 대해, Otten등(1971), Friedman(1976), Boynton(1978), Wray와 Glinos(1978) 및 Ahn등(1978)은 세포분화의 성장에 미치는 cyclic nucleotide의 영향에 관해 보고하였고, Goldberg와 Haddox (1977)는 cyclic GMP의 생물학적 반응조절과 대사에 관해 보고한 바 있다.

Cyclic nucleotide는 염증과 면역반응에도 관여하며(Bourne등, 1974; Deporter등, 1977), Heersche등(1971)과 Dziak과 Stern(1975)은 골세포에 대한 cyclic AMP의 작용에 관해, Ehrlich등(1980)은 연골형성시 세포내 cyclic nucleotide 분포에 대해 보고하였다.

발치창치유는 초기의 염증세포작용, 세포분화 및 골조직 생성과 석회화가 나타나는 복잡한 경과를 가지며 이러한 반응에 대한 cyclic nucleotide의 작용은 상이하게 나타날 것임으로 발치와내 조직의 cyclic nucleotide함량변화와 효소활성도를 관찰함으로써 발치창 치유과정기전을 밝히고자 한다.

## II. 실험 방법

### 1) 동물실험

체중 2~3kg 정도인 집고양이를 성의 구별없이 선택하여 nembotal(35mg/kg, 체중)의 복강내주사로 전신마취한 후 상악견치를 치과용 straight elevator로 완전 탈구시키고 치근 파절이 없이 발치감자로 발치하고 지혈시켰다. 발치후 감염을 방지하기 위해 수성페니시린(한독약품)을 400,000 I. U./day로 2일간 근육주사하였다.

실험군은 발치후 1일, 3일, 5일, 7일, 14일 및 28일 경과군으로 나누었고 각 실험군에 6마리의 고양이를 사용하였다. 실험기간이 경과한 후 마취하에 발치와를 포함한 주위 악골조직을 절제하여 즉시 액체질소로 냉동시켜 보관하였다.

### 2) 시료준비 및 분석

액체질소로 냉동된 악골의 발치와 내용물을 냉동된 상태로 채취하였으며 이때 치조골이 포함되지 않도록 하였다.

발치와 내용물은 냉동실에서 액체질소로 냉각된 유발로 분쇄한 다음 습중량을 측정하고 필요량을 Pyrex glass homogenizer에 옮겨 분석에 적절한 조직처리를 시행하였다.

Cyclic nucleotides추출 및 분석: 냉동된 조직을

4°C에서 1ml의 6% TCA(Trichloroacetic acid, Wako Chem. Co.)으로 균질화한 다음 2500×G에서 15분간 원심분리하여 상청액을 얻었다. 이 상청액을 5ml water-saturated ether(Wako Chem. Co.)로 4회 추출하고, 수용액 부분을 냉동 건조하였고, 추출한 cyclic nucleotide는 sodium acetate buffer로 용해하여 농도측정에 직접 사용하였다.

Cyclic AMP와 cyclic GMP농도는 cyclic AMP 및 GMP RIA Kit(New England Nuclear)를 사용하여 radioimmunoassay방법으로 측정하였다.

Alkaline Phosphatase활성도 측정: 분쇄된 발치와 내용물을 4°C 0.25M sucrose용액으로 약 20배 희석하여 균질화하고, 2,500×G에서 원심분리하여 얻은 상청액을 효소활성도 측정에 사용하였다.

Alkaline phosphatase 활성도는 알카리용액에서 p-nitrophenyl phosphate를 기질로 하여 효소에 의해 유리되는 p-nitrophenol 농도를 측정하는 Bessy-Lowry변법(Colowick와 Kaplan, 1957)을 이용하였으며 alkaline phosphatase활성도는 38°C에서 1시간에 유리되는 p-nitrophenol을 mM로 표시하였다.

## III. 실험 성적

### 1) Cyclic AMP 함량

발치후 각 실험군에서 발치와 조직의 cyclic AMP

Table 1. Changes on Contents of Cyclic Nucleotides and Activity of Alkaline Phosphatase During the Healing of Extraction Wounds in Cats.

	cAMP pmol/gm	cGMP pmol/gm	cAMP/cGMP	Alkaline phosphatase (Unit)
plasma	15.83±1.63	2.08±0.29	9.07±1.07	94.6±8.2*
1 day	30.22±5.27	3.97±0.41	8.11±1.88	734.2±89.5**
3	39.69±5.87	8.06±0.91	6.30±0.04	617.3±55.2
5	57.45±6.45	10.02±0.64	6.19±1.07	597.4±54.3
7	165.65±29.86	9.48±0.37	16.23±3.99	1001.0±77.1
14	109.94±16.20	16.07±1.36	6.66±0.77	1100.0±60.7
28	132.55±11.80	19.89±2.31	6.66±0.41	782.2±105.6

Unit: \* : mM p-nitrophenol/100ml, plasma/hr

\*\* : mM p-nitrophenol/gm, tissue/hr

함량을 pmol/gm ; wet tissue로 계산하여 제 1 표와 제 1 도에 표시하였다.

발치후 1일 경과군에서 cyclic AMP는  $30.22 \pm 5.27$  pmol로 혈장보다 높은 농도를 보였으며 3일과 5일 경과군에서도 계속 증가하였고, 7일 경과군에서는 급격히 상승하여  $165.65 \pm 29.86$  pmol로 가장 큰 변화를 보였다. 14일 경과군에서는 7일 경과군에

비해 감소하였으나 5일 경과군보다는 매우 높았으며, 28일 경과군에서 다시 증가하여  $132.55 \pm 11.80$  pmol을 나타내었다.

## 2) Cyclic GMP 함량

발치와 조직의 cyclic GMP함량은 발치후 1일 경과시  $3.97 \pm 0.41$  pmol을 나타내었으며, 3일과 5일 경과군에서 현저히 증가하여 각각  $8.06 \pm 0.91$  pmol,

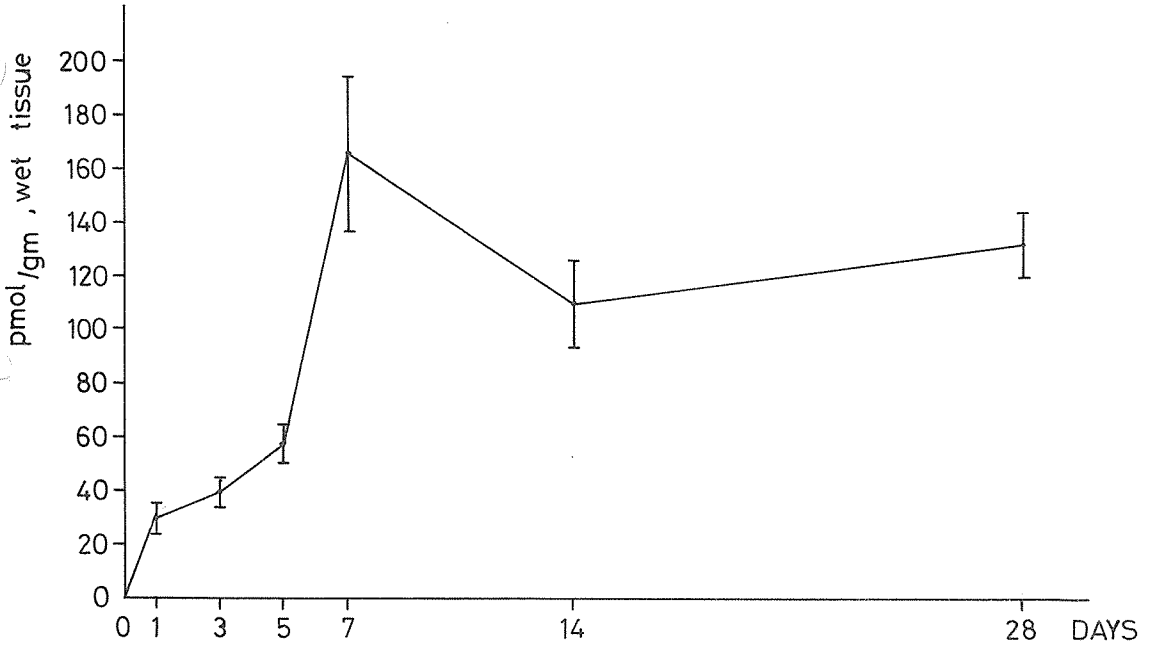


Fig. 1. Changes on Contents of Cyclic AMP During the Healing of Extraction Wounds in Cats.

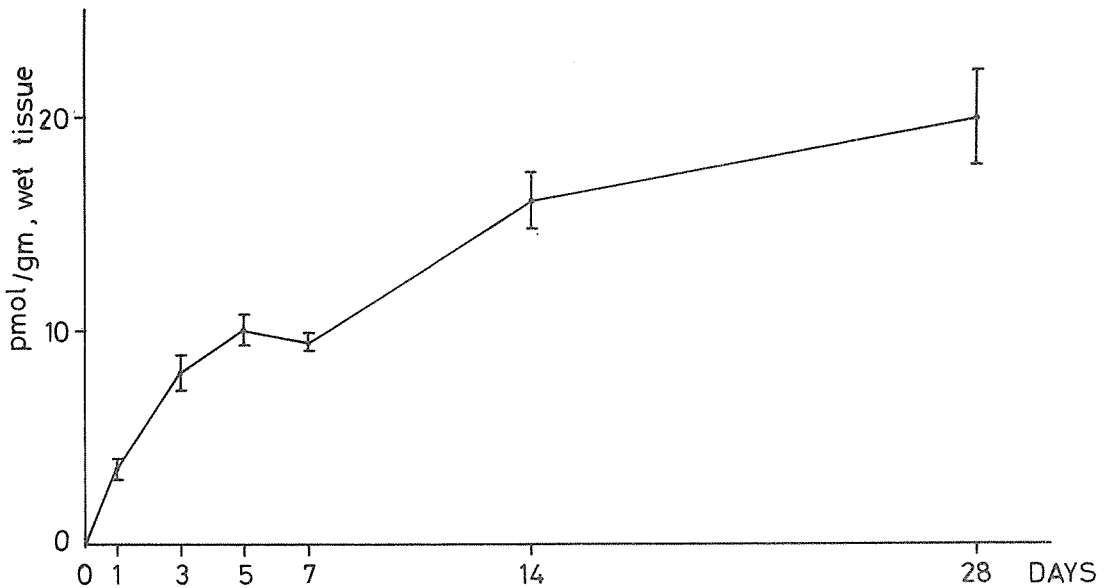


Fig. 2. Changes on Contents of Cyclic GMP During the Healing of Extraction Wounds in Cats.

10.02±0.64pmol을 보였으나 7일 경과군에서 약간 감소하였다. 그러나 14일 경과군에서 다시 증가하며 28일 경과시 가장 높은 값을 나타내었다(제 1표, 제 2도).

### 3) Cyclic AMP/cyclic GMP 비율

발치후 1일 경과시 발치와 조직의 cyclic AMP / cyclic GMP비율은 혈장의 비율과 차이가 없으나 3일 경과군에서 감소하여 5일, 14일, 28일 경과군

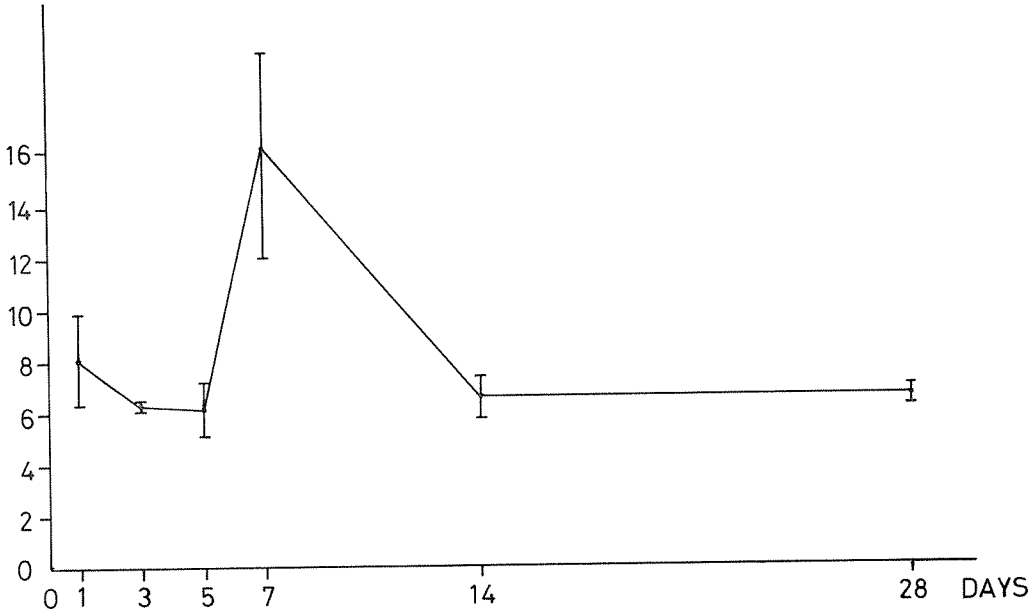


Fig. 3. Changes on Cyclic AMP/Cyclic GMP Ratio During the Healing of Extraction Wounds in Cats.

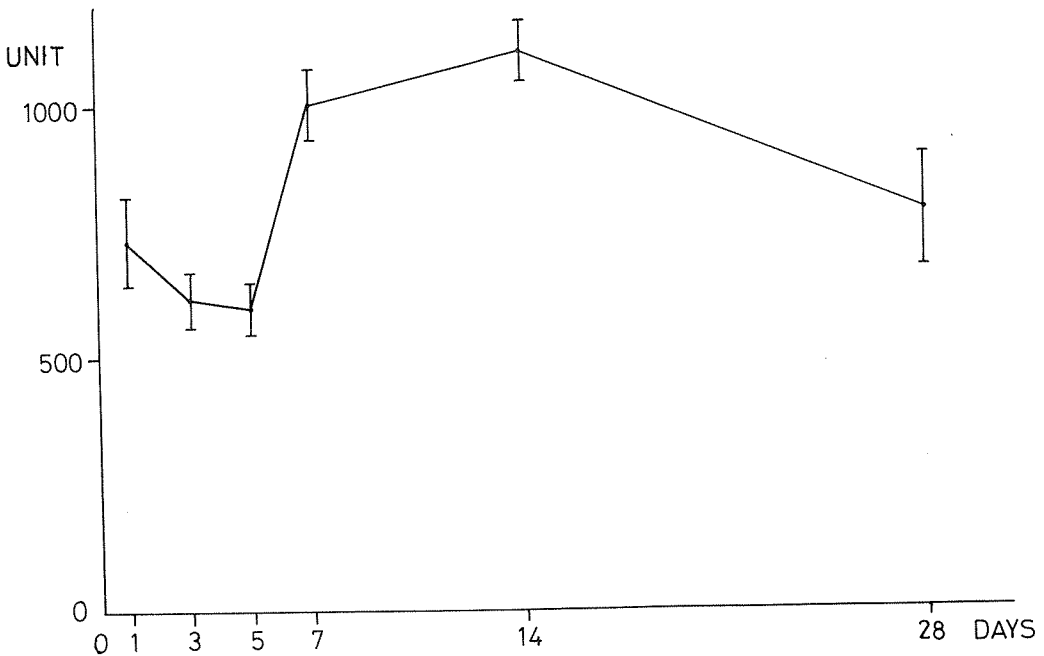


Fig. 4. Changes on Activity of Alkaline Phosphatase During the Healing of Extraction wounds in cats.

Unit: mM p-nitrophenol/gm, tissue/hr.

과 같이 거의 일정한 값을 나타내었다. 그러나 7일 경과군에서 cyclic AMP/cyclic GMP 비율이 현저히 증가하였다(제 1 표, 제 3 도).

#### 4) Alkaline phosphatase 활성도

발치와 조직의 alkaline phosphatase 활성도는 발치 후 1일 경과시 734.2±89.5 unit로 혈장보다 매우 높은 값을 보이나, 3일, 5일 경과군에서 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 7일 경과군에서 1001.0±77.1 unit로 현저히 증가하였고, 14일 경과군에서 가장 큰 활성도를 보였으며, 28일 경과군에서는 782.2±105.6 unit로 감소하였다. 이러한 alkaline phosphatase 활성도 변화는 cyclic AMP/cyclic GMP 비율의 변화와 일치하는 경향을 보여주고 있다(제 1 표, 제 4 도).

### IV. 고 찰

외상으로 손상을 받은 골조직과 발치창상의 치유 과정은 유사하며, 이것은 조직세포의 분화와 골형성이 이루어짐으로서 골조직 재생이 완성된다.

발치와내에 혈병이 형성되고, 염증세포의 침윤이 나타나며 초기에는 섬유원세포가 증식해서 결체조직을 형성하나 1주일을 전후해서 조골세포들이 출현하여 신생골 형성이 관찰되며 계속적인 성숙과 골개조가 일어난다(Huebsch 등, 1952; Amler 등, 1960; Boyne, 1966; Pietrokovski, 1967; 김, 1972; Sela와 Jaffe, 1977).

조직의 분화와 성장은 신진대사에 의해 영향을 받으며 세포성장을 조절하는 물질로 cyclic nucleotides가 있다. Cyclic AMP와 cyclic GMP는 섬유원세포의 배양에서 세포의 증식과 성장을 조절하며(Ahn 등, 1978; Wray와 Glinos, 1978; Boynton 등, 1978), 생체 내에서도 증식중인 섬유원세포에서 cyclic nucleotide가 변화하고(Davidovitch 등, 1978), 염증반응에도 관여하고 있어(Weinstein과 Shearer, 1974), 발치후 창상치유초기에 증가하는 cyclic nucleotide 변화는 이러한 조직반응과 깊은 관계가 있으리라 생각된다.

조직분화에 의해 조골세포가 출현되는 시기는 발치후 1주일 전후로서 이 시기와 일치해서 cyclic AMP의 급격한 증가와 cyclic AMP/cyclic GMP 비율이 현저히 증가한다는 현상은 세포성장의 시작이 cyclic AMP의 증가로 이루어지며 이때 cyclic AMP/cyclic GMP 비율이 증가한다는 Wray와 Glinos (19

78)의 결과와 부합된다.

골조직생성이 계속되면서 조직내 cyclic nucleotides가 증가하는 것은 cyclic AMP가 collagen 생합성에 영향을 주지 못하고(Harper 등, 1979), 골세포에서 칼슘이동을 증가시키지 않지만(Dziak과 Stern, 1975), 조골세포에서 cyclic AMP가 protein kinase의 활성화를 유발하고(Partridge 등, 1981), 생체에서 분비되는 부갑상선 호르몬, 칼시토닌, 인슐린 등이 골형성능력이 있는 세포에서 adenylate cyclase와 guanylate cyclase 활성도를 증가시키는 사실과(Walling 등, 1978) 관련이 있는 것으로 생각된다.

Alkaline phosphatase는 석회화 과정에 관계가 있으며(Gomori, 1943), 생성중인 경조직에서 경조직을 형성하는 세포에 높은 활성도가 관찰되었다(Magnusson 등, 1974; Hasselgren 등, 1978).

발치와 조직의 alkaline phosphatase 활성도는 1일 경과군에 비하여 3, 5일 경과군에서 감소하는 경향을 보여 섬유원세포 증식이 있는 시기에서는 alkaline phosphatase 활성도가 변화하지 않는다는 Ashton 등(1980)의 결과와 유사하였고, 1주일 경과시 급격히 증가하여 발치와내의 조골세포 출현시기와 일치하고 있다. 골조직에서의 alkaline phosphatase 활성도는 조골세포에서 가장 높고(Hasselgren, 1978), 발형성 정도에 비례해서 활성도가 증가하며(Teaford와 White, 1964), 조골세포에서 석회화중인 골기질로 분비되고 matrix vesicle과 bone nodule에 국재하는 것을 볼 수 있다(Bernard, 1978).

Alkaline phosphatase 활성도는 발치와 조직의 cyclic nucleotides 함량변화와 관계있는 것으로 사료된다. 이러한 현상은 2차 상아질을 형성하는 조상아 세포층에 cyclic AMP가 증가하고 alkaline phosphatase 활성도가 높다는 Choby 등(1981)의 보고와 cyclic AMP가 배양세포에서 alkaline phosphatase 생합성을 유발시킨다는 사실과(Firestone와 Heath, 1981) 유사한 결과라 생각되나 초기의 발치와 조직의 alkaline phosphatase 활성도 변화는 cyclic AMP/cyclic GMP 비율 변화와 일치하고 있어 효소활성도는 cyclic nucleotides 함량보다 비율에 의해 영향을 받을 수 있으리라 사료된다.

### V. 결 론

정상적인 발치창상의 치유에 따른 발치와 조직의

cyclic nucleotides 함량과 alkaline phosphatase 활성도의 변화를 관찰하기 위해 체중 2~3kg 정도의 성숙한 집고양이를 사용하였다.

실험동물을 1일, 3일, 5일, 7일, 14일 및 28일 경과군으로 나누고 실험기간이 경과한 후 희생시켜 발치와 조직을 채취하고 균질화하여 cyclic nucleotides를 추출하였고, 조직의 alkaline phosphatase를 분리하였다.

Cyclic AMP와 cyclic GMP 농도는 radioimmunoassay 방법으로 측정하였고, alkaline phosphatase 활성도는 Bessy-Lowry 방법으로 측정하여 분석한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 발치와 내 조직의 cyclic AMP 함량은 창상치 유경과에 따라 현저히 증가하였고, 7일 경과군에서 가장 큰 변화를 보였다.
2. Cyclic GMP는 3일 경과군에서 증가하기 시작하였으며 7일 경과군에서 약간의 감소를 보이나 28일 경과군에서 최고치를 나타내었다.
3. Cyclic AMP / cyclic GMP 비율은 7일 경과군에서 현저히 증가하였으나 나머지 실험군에서는 거의 일정하였다.
4. 발치와 내 조직의 alkaline phosphatase 활성도는 3, 5일 경과시 감소하나 7일 경과군에서 현저히 증가하여 14일 경과시 가장 큰 활성도를 보였다.
5. 발치와 창상치유의 초기에 나타나는 alkaline phosphatase 활성도 변화는 cyclic AMP/cyclic GMP 비율의 변화와 일치하였다.

(本 論文을 完成함에 있어 始終 助言과 協助하여 주신 口腔外科學敎室 敎授님, 醫局員과 口腔生理學敎室 敎授님, 醫局員께 深甚한 謝意를 表하는 바입니다.)

#### - REFERENCES -

Ahn, H.S., S.G. Horowitz, H. Eagle and M.H. Makman: Effects of cell density and cell growth alterations on cyclic nucleotide levels in cultured human diploid fibroblast. *Exp. Cell Res.* 114:101, 1978.

Amler, M.H., P.L. Johnson and I. Salman: Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J.A.D.A.* 61:

32, 1960.

Ashton, B.A., T.D. Allen, C.R. Howlett, C.C. Eaglesom, A. Hattori and M. Owen: Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin. Orthop.* 151:294, 1980.

Bernard, G.W.: Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in initial intramembranous osteogenesis. *Clin. Orthop.* 135: 218, 1978.

Bourne, H.R., L.M. Lichtenstein, K.L. Melmon, C.S. Henney, Y. Weinstein and G.M. Shearer: Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science* 184:19, 1974.

Boyne, P.I.: Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *Oral Surg.* 21:805, 1966.

Boynton, A.L., J.F. Whitfield, R.J. Isaacs, R. G. Tremblay: An examination of the roles of cyclic nucleotides in the initiation of cell proliferation. *Life Science* 22:703, 1978.

Choby, M.A., J.L. Shanfeld, P.C. Montgomery and Z. Davidovitch: Simultaneous localization of cyclic AMP and alkaline phosphatase in feline dental pulp. *J. Dent. Res.* 60 (Special Issue A): 422, IADR Abstracts No. 447, 1981.

Colowick, S.P. and N.O. Kaplan: *Methods in enzymology*, vol. IV, pp. 371, Academic Press, New York, 1957.

Davidovitch, Z., P.C. Montgomery and J.L. Shanfeld: Immunohistochemical localization of cAMP and cGMP in proliferating fibroblast in vivo. *IADR Abstracts No. 74*, 1978.

Deporter, D.A., P.A. Dieppe, M. Glatt and D.A. Willoughby: The relation of cyclic AMP levels to phagocytosis and enzyme release in acute inflammation in vivo. *J. Path.* 121:1, 1977.

Dziak, R. and P.H. Stern: Calcium transport in isolated bone cells. III. Effects of parathyroid hormone and cyclic 3', 5'-AMP. *Endo-*

- crinology 97:1281, 1975.
- Ehrlich, J., A. Yaffe, J.L. Shanfeld, P.C. Montgomery and Z. Davidovitch: Localization of cyclic nucleotides in the rat condylar cartilage following occlusal alterations. IADR Abstracts No. 1076, 1980.
- Firestone, G.L. and E.C. Heath: The cyclic AMP-mediated induction of alkaline phosphatase in mouse L-cells. *J. Biol. Chem.* 256:1396, 1981.
- Friedman, D.L.: Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. *Physiol. Rev.* 56:652, 1976.
- Goldberg, N.D. and M.K. Haddox: Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 46:823, 1977.
- Gomori, G.: Calcification and phosphatase. *Am. J. Path.* 19:197, 1943.
- Harper, R., J.N.M. Heersche and J. Sodek: Effects of parathyroid hormone and prostaglandin E on collagen metabolisms and cAMP response in isolated bone cells. IADR Abstracts No. 251, 1979.
- Hasselgren, G.: Alkaline phosphatase in developing teeth and bone of man and macaque monkey. *Acta Odontol. Scand.* 36:143, 1978.
- Hasselgren, G., A. Franzén and L.E. Hammarström: Histochemical characterization of alkaline phosphatase in developing rat teeth and bone. *Scand. J. Dent. Res.* 86:325, 1978.
- Heersche, J.N.M., S.A. Fedak and G.D. Aurbach: The mode of action of dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate on bone tissue in vitro. *J. Biol. Chem.* 246:6770, 1971.
- Huebsch, R.F., R.D. Coleman, A.M. Frandsen, H. Becks: The healing process following molar extraction. I. Normal male rats (Long-Evans strain). *Oral Surg., Oral Med. & Oral Path.* 5:864, 1952.
- Jeffree, G.M.: Phosphatase activity in the limb bones of monkeys with hyperparathyroidism. *J. Clin. Path.* 15:99, 1962.
- Kim, J.K.: Experimental study on extraction wound healing. *J. Kor. Dent. Asso.* 10:289, 1972.
- Magnusson, B.C., G. Heyden and T. Arwill: Histochemical studies on alkaline phosphatases in mineralizing oral tissue in the mouse. *Calcif. Tissue Res.* 16:169, 1974.
- Otten, J., G.S. Johnson and I. Pastan: Cyclic AMP levels in fibroblast: relationship to growth rate and contract inhibition of growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44:1192, 1971.
- Partridge, N.C., B.E. Kemp, M.C. Veroni and T.J. Martin: Activation of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in normal and malignant bone cells by parathyroid hormone, prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin. *Endocrinology* 108:220, 1981.
- Petrokovski, J.: Extraction wound healing after tooth fracture in rats. *J. Dent. Res.* 46:232, 1967.
- Sela, J. and A. Jaffe: The role of bone remodelling in the healing of extraction socket in rats. A scanning electron microscope study. *Acta Anat.* 97:241, 1977.
- Teaford, M.E. and A.A. White: Alkaline phosphatase and osteogenesis in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117:541, 1964.
- Walling, M.W., V. Marvaso and G.W. Bernard: Stimulation of guanylate cyclase activity in cultured osteogenic murine calvarial mesenchymal cells by PTH, calcitonin and insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83:521, 1978.
- Wray, H.L. and A.D. Glinos: Cyclic nucleotides and growth regulation in suspension cultures of mammalian cells. *Am. J. Physiol.* 234:C131, 1978.

# STUDY ON THE CONTENTS OF CYCLIC NUCLEOTIDES AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN THE EXODONTIC WOUND HEALING

Sang Kyun Park, D.D.S.

*Department of Oral Surgery, Graduate school, Seoul National University*

*(Directed by Prof. Dong Kyu Yang, D.D.S.)*

..... » Abstract « .....

This experiment was performed to study the changes on contents of cyclic nucleotides and activity of alkaline phosphatase in the normal healing process of extraction wounds.

The adult cats, weighing 2-3 kg, were anesthetized with nembutal and the upper canines were extracted.

After the experimental period, the animals were sacrificed and the tissues within the extraction sockets were immediately collected, and prepared for analysis.

The concentrations of cyclic AMP and cyclic GMP were analyzed by radioimmunoassay, and the activity of alkaline phosphatase was determined by Bessy-Lowry method.

1. The content of cyclic AMP in extraction sockets was markedly increased according to experimental period and the greatest at 7 days.
2. The content of cyclic GMP was gradually increased from 3 days after extraction and slightly decreased at 7 days, but the greatest at 28 days.
3. The ratio of cyclic AMP to cyclic GMP was significantly increased at 7 days, but constant in other experimental groups.
4. The activity of alkaline phosphatase in extraction sockets was decreased at 3 and 5 days comparing with 1 day, but markedly increased at 7 days and the highest at 14 days.
5. The changes on activity of alkaline phosphatase which appears in early stage of the healing of extraction wounds coincided with the changes of cyclic AMP/cyclic GMP ratio.