

염증성 치은에서 Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA), α-1-antichymotrypsin, Fibronectin, Transglutaminase의 분포에 관한 면역조직화학적 연구

김재현 · 유형근 · 김성호

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주 조직의 상태는 치아 표면과 치은 열구 내에 존재하는 세균과 숙주간의 상호 작용에 의해 좌우된다. 치은 열구가 치주낭으로 전환 되는 것이 치주 질환의 특징적인 조직 변화이고, 치주낭 조직 내에서 치태 세균에 의한 조직 파괴 기전과 파괴된 조직을 회복시키려는 기전이 동반되어 매우 복잡한 조직 반응이 발생되고 있음이 밝혀졌다^{1,2)}.

치주염 중 가장 빈발하는 형태인 성인형 치주염은 일정한 파괴 양상없이 전반적으로 대부분의 치아를 침범하며, 수 년에서 수 십년에 걸쳐 진행되며 치태 침착부에 발생한다. 치은 열구 상피는 비각화 편평 상피로 이루어져 있으며 각화 잠재성을 지니고 있어 세균침투에 대해 중요한 방어 역할을 하고 있으나 최근에는 이 열구 상피를 통해 치주염이 있을 때 조직을 손상시킬 수 있는 물질들이 치은 결합 조직 내로 침투되어 치주 조직의 파괴를 일으킨다고 알려져 왔다.

증식세포 핵항원(Proliferating cell nuclear antigen, 이하 PCNA)은 증식 중인 세포와 DNA를 합성하는 세포를 면역조직화학적 방법으로 알 수 있는 대표적인 것으로써, 증식세포 내에 존재하는 DNA polymerase의 보조 단백질

질이며 세포 주기중 주로 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐 합성된다^{4,5)}. 또한 PCNA는 분자량 36 kDa으로 DNA 합성에 필수적인 산성 단백질이며, 증식중인 세포내에서 다양한 농도로 발견된다. 특히 PCNA는 조직내 증식중인 세포에서만 제한적으로 나타난다는 점을 이용하여 세포 증식에 대한 평가 지수로 다양한 질병의 진단에 활용되고 있으며⁶⁾ 치은 증식의 경우에도 사용되어졌다⁷⁾.

치태 세균이 신체내에 침투하여 숙주 방어 기전의 평형을 깨뜨리게 되면 여러 종류의 염증 세포들이 나타나 세균이나 세균 구성성분에 대해 탐식 작용을 하게 된다. 결합조직내에서 단핵 대식세포를 확인하는데 사용되는 α-1-antichymotrypsin 항체는 직장, 피부, 편도 등에서 단핵구 및 대식세포에 강한 염색을 보이며 다핵세포가 대식세포 기원임을 밝히거나 대식세포의 숫자를 동정하는 데 이용되어 왔으나^{8,9)} 치주낭 조직에서의 면역조직화화학적 분포 변화는 많이 알려져 있지 않다.

세포외간질(ECM)은 부착 단백질이 기능하는 망상조직(network)일 뿐 아니라 세포 이주의 관문 역할을 하며, 여러 촉매 활성 효소가 있는 부위이다. 그 중 fibronectin은 분자량이 200 kDa에서 250 kDa에 이르는 2개의 소단위가 disulfide 결합에 의해 연결되어 이루어진 당단

백질이다¹⁰⁾. Fibronectin은 세포 fibronectin과 혈장 fibronectin으로 구분되며 세포 fibronectin은 비수용성 단백질과 유사한 구조를 가지며 결체조직 및 기저막에 존재하며, 혈장 fibronectin은 수용성 단백질과 유사한 구조를 가지며, 혈장, 뇌척수액 등의 체액에 존재한다. Fibronectin은 세포 부착성, 세포 골격형성, 세포의 변형, 세포 분화, 세포 이동과 화학주성 등에 중요한 역할을 하며 조직 손상부의 섬유소 혈병 위에 피막을 형성하여 교원질 형성을 도움으로써 지혈 및 창상 치유에도 커다란 역할을 한다고 보고되고 있다¹¹⁻¹⁶⁾. 또한 이물질과 세균에 대한 대식세포의 탐식작용에 관여하여 조직 방어 기전에 중요한 역할을 하기도 한다. 섬유모세포는 염증 반응시에 중요한 역할을 하며, 결체조직의 조직변화는 주로 세포의 기질의 변형에 의존되기 때문에 이 기질 요소 중의 하나인 fibronectin을 이용하여 치은 염증 시에 나타나는 변화를 살펴보고자 하였다.

Guinea pig의 모낭과 소 및 사람의 상피에서 정제되는 transglutaminase는 ϵ -(γ -glutamyl) lysine bond에 의해 polypeptide chain의 공유 교차결합을 증가하고 칼슘에 의존적이며 용해성이 있고, 각질을 안정화시키는 역할을 한다¹⁷⁻²⁰⁾. 각질세포 transglutaminase는 대개 membrane bound이고, 분화가 많이된 층에 국한되어 중층 편평 상피에서 발현된다¹⁸⁻²¹⁾. 조직내 transglutaminase는 최근에 cloning되었고 대식세포와 혈관 내피 세포에서도 발현되는 반면²¹⁾, A431 편평암세포, 섬유모세포 혹은 비상피 조직과 세포에서는 발현되지 않는다고 하여 그 생물학적 중요성은 아직 완전히 이해되지 못하고 있다. 또한 이는 세포내 효소이지만, 막동요(membrane perturbation) 또는 외인성으로 transglutaminase가 유입되었을 때 세포외간질인 fibronectin 양의 증가가 있다고 하여^{22, 23)} 치주 영역에서도 연구의 필요성이 증가되고 있다.

본 연구는 염증성 치은의 상피 및 결체조직 내에서 세포 증식을 확인하기 위해 PCNA, 치은 조직내의 대식세포를 알아보기 위하여 α -1-antichymotrypsin, 대식세포의 탐식작용에 관여하여 조직방어 기전에 중요한 역할을 하는 fib-

ronectin과 fibronectin에 교차결합을 해서 섬유소 안정을 촉진하는 transglutaminase에 관한 면역 조직 화학적 발현 정도 및 분포 변화를 알아보고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구대상

1994년 6월에서 1994년 12월 사이에 원광대학교 부속 치과 병원 치주과에 내원한 환자중 염증성 치은 조직으로 성인형 치주염 30례, 건강한 치은으로는 치관 변연연장술을 목적으로 절제한 치은 10례를 대상으로 하여 조직표본을 얻었다. 염증성 치은군의 연령은 25세에서 67세(평균 47.3세)였고, 남성이 18명, 여성이 12명이었으며, 건강한 치은군의 연령은 18세에서 38세(평균 24.2세)로 남성이 7명, 여성이 3명이었다.

2. 연구방법

염증성 치은은 치간유두와 치주낭 직하부를 포함하여 최소 0.2×0.2 cm 이상의 크기로 치근면에 수직으로 절제한 다음, 절취된 치은조직편을 10% 중성포르말린에 고정된 후 통법에 따른 파라핀 포매 후 4-6 μ m의 조직편을 Poly-L-lysine으로 피막한 슬라이드에 부착한 후 조직병리학적 관찰을 위한 H & E 염색과 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 건강 치은은 치관 변연 연장술시에 절제되는 조직을 0.2×0.2 cm의 크기로 다듬은 후 위와 동일한 방법으로 처리하였다.

1) 사용항체

연구에 사용된 항체는 PCNA(monoclonal, Dako, USA), α -1-antichymotrypsin(polyclonal, Dako, USA), fibronectin(polyclonal, Vector), transglutaminase(polyclonal, Biogenex)이었고, 면역 조직화학 염색방법은 LSAB(labelled streptavidine biotin, Dako, USA)을 이용하였다.

2) 면역조직화학 염색

각 파라핀 절편을 탈파라핀화 및 수화시킨 후 3% 과산화수소수 용액내에 20분간 처리하여 내인성 peroxidase의 활성을 제거하였다. 일차 항체로는 위의 4가지 항체를 순서대로 각각 1/100, 1/100, 1/50, 1/100의 농도로 희석해 100분간, 생쥐의 혈청에서 추출한 이차항체(anti-mouse IgG, Dako, USA)를 40분간 반응시켰다. 그 후 Streptavidine alkaline phosphatase로 30분간 반응시킨 후 Aminoethyl carbazole (AEC)로 발색시키고 Harrison hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerin으로 도포 후 검경하였다. 음성 대조군은 일차 항체 대신 생리 식염수를 사용한 후 동일 방법으로 염색하였다.

3) 조직학적 관찰 및 계측

염색된 조직표본에서 각각의 항체에 대한 양성반응을 상대적인 발현정도에 따라 음성(-), 경미(±), 경도(+), 중등도(++), 심도(+++)로 구분하여, 상피에서는 기저층, 상피저층, 유극층, 각화층의 4층과 결체조직에서 관찰하였다.

PCNA 계측은 광학현미경(200배)으로 3부위 이상 사진촬영하여 핵내에 중등도 이상의 반응을 양성으로 판정하였으며, 3명의 관찰자가 각각의 사진에서 세포수를 계측하여 양성 세포수를 측정 세포수로 나누고 백분률로 환산하여 PCNA 지수를 구하였다. Transglutaminase 양성 세포 수도 위와 동일한 방법으로 판정하여 계산해 내었다.

4) 통계처리

군간의 차이를 보기 위하여 paired t-test를 시행하여 통계학적 유의성을 검증하였다.

III. 연구성적

1. 광학현미경적 관찰

건강치은조직은 염증세포 침윤은 거의 없었고 결체조직 유두돌기의 증식이 약간 관찰되었으며 풍부한 섬유모세포들이 보였다. 염증성 치은 조직 내에서는 염증세포의 침윤이 뚜렷하여

주로 만성 염증 세포인 임파구 등으로 구성되어 있었고 유두돌기의 증식과 함께 결체조직은 심한 부종 및 모세혈관 증식을 보였다.

2. 면역조직화학적 관찰

1) PCNA 분포(Table 1,5)

Monoclonal anti-Human PCNA항체에 대한 면역염색정도는 건강 치은의 경우 상피세포의 핵을 중심으로 양성반응이 나타났으며 상피의 표층에는 거의 관찰되지 않고 대부분 기저층에 위치하였다(사진 1). 염증성 치은에서는 기저층 및 부기저층에 주로 양성세포들이 분포하여(사진 2,3) 세포내 DNA합성세포의 분포변화가 관찰되고(사진 2,3,4) 결체조직의 섬유모세포 내에서는 양성세포를 관찰할 수 없었다. PCNA 표지지수는 건강 치은에서는 4.91 ± 2.97 이고, 염증성 치은에서는 10.49 ± 4.36 의 높은 PCNA 지수를 보였으며 두 군 간에 통계학적 유의성이 있었다($P < 0.05$).

2) α -1-antichymotrypsin 분포(Table 2,5)

건강 치은의 상피에서는 양성세포가 관찰되지 않았고, 결체조직내에서도 미미하였으나(사진 5), 염증성 치은조직에서는 상피의 기저층에 걸친 Langerhans세포로 여겨지는 수지상세포에 양성 반응을 보였으며 섬유모세포 및 단핵세포내에서도 α -1-antichymotrypsin에 양성반응을 보였다(사진 6). 결체조직내의 단위 면적당 양성세포 수에서는 건강치은이 11.10 ± 4.37 이고 염증성 치은이 15.49 ± 8.38 으로 증가되었으나 통계학적 유의성은 없었다.

3) Fibronectin 분포(Table 3)

건강치은 결체조직의 중앙보다는 변연부, 즉 기저막을 따라 기저막 직하부의 잘 발달된 결체조직 유두돌기에 주로 양성반응이 밴드형으로 분포하였으며(사진 7), 기저막과 교원섬유 주행을 따라 원형, 난원형, 길게 늘어진 띠모양까지 세포위치에 따라 다양한 형태로 존재하였다.

염증성 치은의 경우에는 기저막은 물론 교원섬유속 변연부에서 섬유모세포들과 함께 전

반적으로 분포하였으며 혈관내피세포 주위에서 강한 양성반응을 보였다(사진 8,9)

Table 1. Antibody reaction to PCNA in healthy and inflamed gingiva

		epithelium				connective tissue
		BA	SU	SP	KE	
PCNA	HG	++	±	-	-	-
	IG	++	++	±	-	-

BA: basal layer, SU: suprabasal layer, SP: spinous layer, KE: keratin layer

HG: healthy gingiva IG: inflamed gingiva

-: negative, ±: rare, +: mild, ++: moderate, +++: intense

Table 2. Antibody reaction to α -1-antichymotrypsin in healthy and inflamed gingiva

		epithelium				connective tissue
		BA	SU	SP	KE	
α -1-antichymotrypsin	HG	-	-	-	-	±
	IG	±	±	-	-	++

BA: basal layer, SU: suprabasal layer, SP: spinous layer, KE: keratin layer

HG: healthy gingiva IG: inflamed gingiva

-: negative, ±: rare, +: mild, ++: moderate, +++: intense

Table 3. Antibody reaction to fibronectin in healthy and inflamed gingiva

		epithelium				connective tissue
		BA	SU	SP	KE	
fibronectin	HG	+	-	-	-	±
	IG	++	±	-	-	+

BA: basal layer, SU: suprabasal layer, SP: spinous layer, KE: keratin layer

HG: healthy gingiva IG: inflamed gingiva

-: negative, ±: rare, +: mild, ++: moderate, +++: intense

Table 4. Antibody reaction to transglutaminase in healthy and inflamed gingiva

		epithelium				connective tissue
		BA	SU	SP	KE	
transglutaminase	HG	-	-	±	++	-
	IG	-	±	++	+++	±

BA: basal layer, SU: suprabasal layer, SP: spinous layer, KE: keratin layer

HG: healthy gingiva IG: inflamed gingiva

-: negative, ±: rare, +: mild, ++: moderate, +++: intense

Table 5. Proliferation index & positive cells per 3 highpower fields to α -1-antichymotrypsin and Transglutaminase in healthy & inflamed gingiva

	PCNA Proliferating index	α -1-antichymotrypsin positive cells in each High power field($\times 200$)	Transglutaminase positive cells in total cell counts
Healthy Gingiva	4.91 \pm 2.97	11.10 \pm 4.33	22.61 \pm 14.61
Inflamed Gingiva	10.49 \pm 4.36*	15.49 \pm 8.38	45.48 \pm 30.61

* : significantly difference at $P < 0.05$ level

4) Transglutaminase 분포(Table 4, 5)

건강 치은에서는 상피에서만 양성 반응이 관찰되었는데 주로 각화층 및 유극층 상부에서만 표지되었고(사진 10), 기저층 및 상기저층에서는 염색되지 않았으며 결체조직에서는 양성 반응을 보이지 않았다. 염증성 치은의 경우에는 각화층은 물론 유극층과 상기저층까지 양성반응의 증가와 함께 하방이동이 관찰되었고, 결체조직에서는 모세혈관 주위에서만 양성 반응을 보였으며 염증으로 인한 유두돌기의 증식부위에서도 양성반응을 보였다(사진 11, 12). 단위 면적당 양성세포수에서는 건강치은이 22.61 \pm 14.61이고 염증성 치은이 45.48 \pm 30.61로 증가되었으나 통계학적 유의성은 없었다.

IV. 총괄 및 고찰

생체에서 규칙적인 세포의 성장 및 분화는 세포의 기질성분, 세포유착인자, 막복합체 등의 다양한 조절기능에 의해 이루어지며, 세포의 기능적인 다양성을 형태학적으로 증명하고 분석하는 작업중 하나의 연구 수단으로써 면역조직화학적 염색이 사용된다. 면역조직화학적 검색은 in vivo 실험에서 관찰하고자 하는 인자가 어느 부위에 있는지를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 주위조직의 형태학적 특성까지도 관찰할 수 있어 그 연관성을 확인할 수 있다. 또한

개개의 세포단위로 여러 조직병리학적 소견과 항원 표현과의 관계를 연구할 수 있다는 장점이 있다²⁴⁾.

세포증식에 대한 지수로써 본 연구에서는 PCNA를 이용하였는데 Celis(1987)²⁵⁾는 PCNA가 DNA 복제 과정과 세포분열 과정에서 중심 요소로 작용한다고 보고하였고, Fairman(1990)²⁶⁾은 DNA 복제과정 뿐만 아니라 DNA 손상부에서도 발현된다고 보고하였다. 세포분열 가정에서 합성기일 때 세포의 핵내에 PCNA가 축적되어 그 발현이 최고치를 보인다고 많은 학자들^{25, 27)}에 의해 보고되었는데, Morris 등(1989)²⁸⁾은 DNA 합성이 가장 왕성할 때 최고치를 보인다고 하였으며 Kurki 등(1986)²⁹⁾은 G1말기에 PCNA가 발현하기 시작하여 DNA합성시기인 S기에 현저히 증가되었다가 G2와 M기에 감소됨을 보고하였다.

본 연구에서 건강치은 조직내에서의 단클론성 mouse anti-human PCNA에 대한 면역 염색 반응도는 사진 1과 같이 나타났는데, 상피조직의 표층이나 결체조직에서는 PCNA에 양성 세포들이 관찰되지 않았고, 유두돌기 직상부 상피조직중 기저세포층에서만 양성 반응을 나타냄으로써 낮은 PCNA지수(4.9 \pm 2.97)를 보였고, 염증성 치은에서는 기저층 뿐 아니라 부기저층에 양성 세포들이 많이 나타나고 높은 PCNA지수(10.49 \pm 4.36)를 보이며 통계학적으

로 유의성이 있었으며 상피세포의 핵을 중심으로 면역염색반응을 나타냈으나 상피조직의 표층이나 결체조직에서는 건강치은과 마찬가지로 PCNA 양성세포들이 나타나지 않았다.

건강치은의 상피층 중 기저세포층에서만 양성반응을 나타낸 결과는 상피세포가 기저층에서 세포증식을 시작함을 보여준 결과로 사료되며, 특히 상피 돌기부에서 상대적으로 높은 PCNA 지수를 보인 결과는 결체조직 유두돌기의 증식과 상피돌기의 발달간에 깊은 관련성이 있음을 시사하는 결과이다. 또한 염증성 치은은 건강치은에 비해 상피 성장 인자 등의 국소 인자 자극에 의한 세포분열의 증가가 나타났다고 사료되며 결체조직의 섬유아세포 등에서 PCNA 양성세포들이 관찰되지 않은 것은 섬유성 치은증식 조직처럼 섬유아세포의 과증식이나 세포분열, 세포외기질의 증가 등이 나타나지 않았기 때문으로 생각된다.

α -1-antichymotrypsin 항체는 단핵대식계 세포를 확인하는데 주로 이용되어 왔는데^{8,9)} 본 연구에서 건강 치은은 α -1-antichymotrypsin에 대한 양성세포를 상피에서는 관찰할 수 없었고, 염증성 치은에서는 상피와 결체조직 모두에서 관찰되며 특히 기저세포 상층부에 존재하면서 한개 이상의 수지상 돌기(dendritic process)를 보이는 Langerhas cell을 볼 수 있었는데 이는 세균 및 외부 이물질에 대항하기 위해 치은구강상피 등에서 출현했다고 사료된다. 또한 염증 세포 중에서는 대식 및 단핵 세포에서 양성 반응을 보였고 섬유조직내의 섬유 모세포에서도 α -1-antichymotrypsin에 양성 반응을 보였다. 정상적인 세포의 교원질원섬유의 파괴는 교원 분해효소라고 하는 특수한 효소에 의해 일어나고 파괴된 이 작은 조각들은 식작용 과정에 의해 섬유모세포 내로 섭취되어 막으로 둘러싸인 공포 또는 phagosome 안에 위치하게 된다. 결국 phagolysosome에서 교원질 섬유소의 최종분해가 일어나게 되는데 현재까지 알려져 있는 바로는 섬유모세포가 교원질의 합성과 분해를 동시에 할 수 있다고 하며 이러한 과정이 치주인대의 섬유모세포에서 관찰되었다고 한다^{28,29)}. 따라서 본 연구에서 식작용을 하는 세포

즉 섬유모세포에서 α -1-antichymotrypsin에 양성반응을 보인 것은 대식세포의 역할이 교원질 합성을 촉진하고 섬유소를 제거하는 역할을 하며 α -1-antichymotrypsin이 단핵구 및 대식 세포에 양성반응을 보이기 때문으로 사료된다.

fibronectin은 세포성 및 혈장성으로 구분되는 당단백질로써²⁰⁻³³⁾, 최근 세포부착성과 세포이동을 촉진하는 성질을 이용하여 치주과 영역에서 임상적으로 치근면 탈회후에 fibronectin을 도포해 줌으로써 상피조직의 하방이동을 차단하고 치주조직의 신부착(new attachment)을 도모하는데 보다 양호한 결과를 얻을 수 있음이 Caffesse³⁴⁾, Pini Prato 등³⁵⁾은 염증으로 인한 정상조직의 파괴는 fibronectin에 의해 매개되는 세포 기질간의 상호작용이 결핍되는 것과 깊은 관계가 있다고 하여 조직의 구조를 유지하는데 있어서 fibronectin의 중요성을 강조하였는데, 본 연구에서도 염증성 치주낭의 기저부 하방 결체조직층에서는 건강치은의 소견과는 달리 기저막 직하부가 아니라 다소 거리를 둔 심부에서 풍부한 염증세포들의 침윤, 교원질의 소실 및 혈관 증식과 같은 전형적인 염증 소견과 함께 fibronectin이 집중적으로 분포되어 있음이 관찰되었으며 특히 혈관을 중심으로 그 주위에 산재되어 나타났다. 이러한 결과는 개의 치은 결체조직내 fibronectin을 면역형광법으로 관찰한 Cho 등³⁷⁾의 소견과 유사하였다. 또한 염증 소견과 더불어 fibronectin이 집중적으로 분포하는 것은 침투한 치태세균에 대한 식균작용에 fibronectin이 직접 관여하거나 다형핵백혈구와 대식세포의 이동에 대해 화학주성을 나타냄으로써 간접적으로 신체 방어 기전에 막중한 역할을 하고 있음을 보여주는 결과라 할 수 있고, 또한 파괴된 결체조직을 다시 회복하는데 필요한 섬유모세포들이 조직 손상부로 모일 수 있도록 fibronectin이 화학주성 역할과 함께 세포이동에 관여하고 있음을 반영하고 있는 것으로 사료된다³⁸⁻⁴⁰⁾. 본 연구에서 fibronectin에 대한 면역 염색의 분포양상은 건강 치은과 염증성 치은조직에 관계없이 기저막을 따라 상피 직하부 결체조직 유두 돌기부위에 주로 나타났고, 교원섬유속(collagen fiber bundle)의

중양부 보다는 변연부에서 섬유모세포들과 함께 나타났으며, 대체로 기저막과 교원섬유 주행을 따라 과립형으로부터 원형, 난원형, 길게 늘어진 띠 모양까지 세포위치에 따라 다양한 형태로 존재하였다. 따라서 PCNA, α -1-antichymotrypsin, transglutaminase 염색에서 보였던 양성세포가 관찰된 것이 아니라 그림 7,8과 같이 염색상이 띠 모양으로 나타났기 때문에 양성 표지 세포를 계측할 수가 없었고 그 발현 부위 및 정도만을 비교하였다. fibronectin이 결합조직 유두돌기 부위에 주로 분포하고 있음은 결합조직이 상피를 향하여 돌기를 내어 기저막과 연결하는데 fibronectin이 중요한 역할을 하고 있으며 상피를 향한 교원섬유의 증식에도 관여하고 있음을 시사하고 있다.

사람의 배양된 각질세포와 피부 각질층에서 발현되는 transglutaminase의 분자량은 92kDa 이며¹⁷⁾, 많은 세포 및 체액내에 분포하며 혈액 응고를 위한 섬유소 안정을 촉진하고⁴¹⁾, fibronectin에 교차 결합하는 것을 촉매한다. 또한 이 교차결합은 상처부위를 방패처럼 둘러싸서 상처가 치유될 때까지 세포를 보호한다. 또한 간 조직으로부터 조직용해효소 역할, cornified envelope 형성을 하기도 하며 혈소판, 적혈구, 평활근, 폐, 각막에서 calmodulin 의존 효소로 알려져 있다^{42,43)}, Buxam⁴⁴⁾ 등은 transglutaminase를 면역형광법으로 관찰하였는데 사람의 구강점막은 세포질내 형광 발색이 안되고 상피내 희미한 막만을 관찰할 수 있었다고 하였으며, Upchurch²²⁾ 등도 세포의 transglutaminase를 면역 형광 관찰시 세포 표면보다는 세포의 기질에 더 많이 분포한다고 하였으며, 중층편평상피에서도 발현된다고 보고하였으나¹⁸⁾

²⁰⁾ 본 연구에서는 세포의 기질은 거의 염색되지 않은 반면 세포질 내부에서 발현이 되어 약간 상이 하였다. 또한 조직내 transglutaminase는 최근 cloning 되었고 대식세포와 혈관내피세포에서도 발현된다고 하며, 섬유모세포 혹은 비상피조직과 세포에서는 발현되지 않았다고 하였는데²¹⁾, 본 연구에서도 상피조직 및 내피세포에서 발현이 된 것으로 나타났다. 본 연구에서는 transglutaminase에 대해 건강 치은에

서는 상피층중 주로 유극층 상부에서만 표지되었고 기저층 및 상기저층, 결합조직에서는 염색되지 않았고 염증성 치은의 경우에는 각화층은 물론 유극층과 상기저층까지 양성반응의 증가와 이동이 관찰되었으나 결합조직에서는 모세혈관 주위에서만 양성반응을 보였고, 염증으로 인한 유두돌기의 증식부위에서 주로 양성반응을 보여 Gentile 등²¹⁾의 결과와 유사하였다.

이상과 같은 결과를 바탕으로 볼 때 PCNA, α -1-antichymotrypsin, transglutaminase, fibronectin 등의 4가지 일차 항체들은 정상 치은에서의 분포와 염증성 치은에서의 분포가 서로 다름을 알 수 있었는데, 정상에서는 어느 특정 부위나 층에 국한되어 있다가 염증이 생기면 주위 조직으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 치주 질환이 발생하면 염증 반응으로 인한 많은 세포들이 상피와 결합조직으로 모여들어 치주조직의 파괴를 일으키거나 파괴된 조직을 회복시키려는 기전이 동반되는 복잡한 조직반응이 일어남을 알 수 있었다.

본 연구에서는 PCNA, α -1-antichymotrypsin, transglutaminase, fibronectin의 일차 항체를 이용하여 면역 조직화학적 염색을 실시하였는데 다른 연구가 대부분 세포배양을 통한 시험관내의 결과이고 생체내에서의 작용은 유추 해석하였으므로 앞으로도 많은 연구가 요구되는 분야로 여겨지며 더 정확한 정량적 방법의 개발, 다른 성장인자 및 세포의 기질과의 상관관계 및 면역세포와의 관계를 밝히는 연구가 진행되어 명확한 역할을 규명해야 한다고 생각된다.

V. 결 론

저자는 염증성 치은의 상피 및 결합 조직내에서 세포 증식을 확인하기 위해 PCNA, 치은 조직내의 대식세포를 알아보기 위하여 α -1-antichymotrypsin, 대식세포의 탐식작용에 관여하여 조직방어 기전에 중요한 역할을 하는 fibronectin과 fibronectin에 교차결합을 해서 섬유소 안정을 촉진하는 transglutaminase에 관한 면역 조직 화학적 발현 정도 및 분포 변화를

알아보고자 하였다. 성인형 치주염 환자 30명과 치관변연 연장술을 목적으로 절제한 건강치은 10례로부터 조직을 얻어 통법에 따라 파라핀 포매후 H & E 염색과 PCNA, α -1-antichymotrypsin를 이용한 면역 조직화학적 염색을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PCNA에 대한 양성반응은 건강치은에서는 치은상피의 기저세포층에서 주로 관찰되었으며 염증성 치은에서는 기저층 및 상기저층에 분포하여 서로 차이가 있었으며, PCNA 지수도 군간에 통계학적 유의성이 있었다 ($P < 0.05$).
2. α -1-antichymotrypsin 양성세포는 건강치은의 결체조직에서 미미하였고 염증성 치은에서는 상피와 결체조직 모두 증가되었으나 통계학적인 유의성은 없었다 ($P < 0.05$).
3. Fibronectin은 건강 및 염증성 치은 모두 기저막 주위와 교원섬유 속에서 주로 분포하였으며 염증성 치은이 건강치은보다 발현이 약간 증가되었다.
4. Transglutaminase 양성세포는 건강 및 염증성 치은 모두 상피 표층에서 강한 양성반응을 보였고, 염증성 치은의 결체조직에서는 염증세포 침윤부의 모세혈관주위에서 주로 분포하였으며 양성세포수는 염증성 치은이 건강 치은보다 많았으나 통계학적 유의성은 없었다 ($P < 0.05$).

참고문헌

1. Seymour GJ, Horwood BW, Aaskov J, Powell RN : Natural Killer cell activity against human gingival fibroblasts exposed to dental plaque extracts. *J Periodontol* 55 : 89-293, 1984.
2. Page RC, Schroeder HE : Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 176 : 35-249, 1990.
3. Suzuki JB : Diagnosis and classification of the periodontal disease. *Dent Clin North*

Am 32 : 196-216, 1988.

4. Yu CCW, Woods AL, Levinson DH : The assessment of cellular proliferation by immunocytochemistry ; A review of currently available methods and their applications. *Histochemical J.* 24 : 121-131, 1992.
5. Morris GF, Matthews MB : Regulation of cell nuclear antigen during cell cycles. *J Biol Chem* 264 : 13856-13864, 1989.
6. Mathews MB, Berstein RM, Franza BR, Garrels JI : Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309 : 374-376, 1984.
7. 이강남, 한수부, 이대일 : 치은증식시 세포 구성과 성장 인자에 관한 면역조직 화학적 연구, *대한치주과학회지*, 24 : 357-375, 1994.
8. Meis JM, Osborne BN, Butler JJ : A comparative marker study of large cell lymphoma, Hodgkin's lymphoma and true histiocytic lymphoma in paraffin embedded tissue, *Am. Clin. Pathol.*, 86 : 591-599, 1986.
9. Nathrath WBJ, Meister L : Lysozyme (muramidase) and α -1-antichymotrypsin as immuno-histochemical tumors markers. *Acta Histochem.*, (suppl 25) : 9-72, 1982.
10. Hynes RO, Yamada KM : Fibronectins : Multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 195 : 69-377, 1982.
11. Ginsberg MH, Painter RG, Forsyth J, Birdwell C, Plow Zef : Thrombin increases expression of fibronectin antigen on the platelet surface. *Proc Natl Acad Sci* 77 : 049-1053, 1980.
12. Mosher DF, Furcht LT : Fibronectin review of its structure and possible functions. *J Invest Dermatol* 77 : 175-180, 1981.
13. Alitalo K, Hovi T, Vaheri A : Fibronectin is produced by human macrophage. *J Exp Med* 151, 602-613, 1980.

14. Chiquet-Ehrismann R : What distinguishes tenascin from fibronectin. *FASEB* 4 : 2598–2604, 1990.
15. Bissel MJ, Hall HG, Parry G : How does the extracellular matrix direct gene expression. *J Theor Biol* 99 : 31–68, 1982.
16. Berezney R, Coffey DS : Nuclear protein matrix : association with newly synthesized DNA. *Science* 189 : 291–293, 1975.
17. Eckert RL : Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* 69 : 136–1346, 1989.
18. Tracher SM, Rice RH : Keratinocyte specific transglutaminase of cultured epidermal cells : relation to crosslinked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* 40 : 685–695, 1985.
19. Schirley JE, Jetten AM : Characterization of transglutaminase activity in rabbit tracheal epidermal cells. Regulation by Retinoids. *J Biol Chem* 261 : 15097–15101, 1988.
20. Schmidt R, Michel S, Scroot B, Reichert U : Transglutaminase in normal and transformed human keratinocyte in culture. *J Invest Dermatol* 90 : 475–479, 1988.
21. Gentile V, Saydak M, Chiocca EA, Akande O, Birckbichler PJ, Lee KN : Isolation and characterization of c DNA clones to mouse macrophage and human endothelial cells tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 266 : 478–483, 1991.
22. Upchurch HF, Conway E, Patterson MKJ, Birckbichler PJ, Maxwell MD : Cellular transglutaminase has affinity for extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol* 23 : 795–799, 1987.
23. Lorand L, Daily JE, Turner PM : Fibronectin as a carrier for transglutaminase from human erythrocyte. *Proc Natl Sci USA* 85 : 1057–1059, 1988.
24. Horan P, Thor A, Wunderlich D, Muraro R, Cauuso A, Schlom J : Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci* 81 : 5227–5231, 1984.
25. Celis JE, Ceils A : Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells : subdivision of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 3262–3266, 1985.
26. Fairman MP : DNA polymerase/ PCNA actions and interactions. *J Cell Sci* 95 : 1–7, 1990.
27. Bravo R, Macdonald-Bravo H : “Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle : associations with DNA replication sites” 84 : 795–802, 1980.
28. Everts V, Beersten W : Collagen phagocytosis in periodontal remodeling. *The Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation*, The Ohio state University. pp.29–36, 1992.
29. Wahl S : Mononuclear cell-mediated alteration in connective tissue. R.J. Genco and S. E. Mergenhagen (eds), *Host-Parasite Interactions in Periodontal Disease*, pp.225–234 Washington, DC, American Society for Microbiology, 1982.
30. Damsky CH, Bernfield M : Cell to cell contact and extracellular matrix. editorial overview. *Curr Opin Cell Biol* 3 : 777–778, 1991.
31. Clark RA : Potential role of fibronectin in cutaneous wound repair. *Arch Dermatol* 124 : 201–206, 1988.
32. Hayasi M, Yamada KM : Differences in Domain Structures between Plasma and cellular Fibronectins. *J. Biol. Chem.* 256 : 11292–11300, 1981.
33. McDonagh J : Fibronectin : A molecular

- Clue. Arch Pathol. Lab. Med, 105 : 393–396, 1981.
34. Caffesse RG, Smith BA Nasjileti CE, Lopetin DE : Cell Proliferation after Flap Surgery, Root Conditioning and Fibronectin Application. *J. Periodontol.* 58 : 661–666, 1987.
 35. Pini Prato G, Cortellini P, Clauser C : Fibrin and Fibronectin Sealing System in a Guided Tissue Regeneration Procedure : A Case Report. *J. Periodontol.* 59 : 679–683, 1988.
 36. Baum BJ, Wright WE : Demonstration of Fibronectin as a Major Extracellular Protein of Human Gingival Fibroblasts. *J. Dent Res.* 59 : 631–637, 1980.
 37. Cho MI, Lee YL, Garant PR : Localization of Fibronectin in Gingival Connective Tissue of Beagle Dog : Immunofluorescent Light Microscopic Findings” *J. Periodontol.* 56 : 677–685, 1985.
 38. Engel J : Common structural modifs in proteins of the extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 3 : 779–785, 1991.
 39. Getzenberg RH, Pienta KJ, Coffey DS : The tissue matrix cell dynamics and hormone action. *Endocrine Rev* 11 : 399–417, 1990.
 40. Graves DT, Cochran DL : Mesenchymal cell growth factors. *Crit Rev Oral Biol Med* 1 : 17–36, 1990.
 41. Goramn JJ, Folk JE : Structural features of glutamine substrates for human plasma factor VIIla. *J Biol Chem* 255, 419–427, 1980.
 42. Chung SI : Multiple molecular forms of transglutmainase in human and guinea pigs. C.I. Market Acad Press, NY, 259–274, 1975.
 43. Cocuzzi ET, Chung SI : Cellular transglutaminase : Lung matrix associated transglutaminase ; characterization and activation by sulfhydryls. *J Biol Chem* 261 : 8122–8127, 1986.
 44. Buxman MM, Wuepper KD : Cellular localization of epidermal transglutaminae : A histochemical and immunochemical study. *J Histochem Cytochem* 26 : 340–348, 1978.

Explantation of Photography

- Photo 1. Immunostain of PCNA in healthy gingiva.
Red colored PCNA positive cells were present in almost in basal layers of healthy gingiva.(×200)
- Photo 2. Immunostain of PCNA in inflammatory gingival tissue of Adult periodontitis. PCNA positive cells in A.P. were increased than of healthy tissue.(×200)
- Photo 3. Immunostain of PCNA in inflammatory gingival tissue of Adult periodontitis. PCNA positive in A.P. were observed in basal layers.(×200)
- Photo 4. Immunostain of PCNA in inflammatory gingival tissue of Adult periodontitis. PCNA positive cells were noted in pseuddepheliomatous hyperplasia of inflammatory tissue.(×200)
- Photo 5. Immunostain of α -1-antichymotrypsin in healthy gingival tissue.
Positive cells was not observed in epithelium.(×200)
- Photo 6. Immunostain of α -1-antichymotrypsin in inflammatory gingival tissue of A.P. Positive cells in A.P were increased than noninflammatory tissue.(×200)
Immunostain of Fibronectin in healthy gingival tissue.
- Photo 7. Band-like positive cells were noted in Basement memberane.(×100)
Immunostain of Fibronectin in inflammatory gingival tissue of A.P.
- Photo 8. Positive expression were increased than non-inflammmatory tissue.(×200)
Immunostain of Fibronectin in inflammatory gingival tissue of A.P. Positive cells
- Photo 9. were noted in capillary endothelium.(×200)
Immunostain of Transglutaminase in healthy gingival tissue.
- Photo 10. Superficial epithelium layer were positive expressed.(×40)
Immunotain of Transglutaminase in inflammatory gingival tissue of A.P.
- Photo 11. Positive cells were noted in suprabasal and spinous layer.(×100)
Immunostain of Transglutaminase in inflammatory gingival tissue of A.P. Positive
- Photo 12. cells were noted in endothelium.(×100)

논문사진부도 ①

사진 1

사진 2

사진 3

사진 4

사진 5

사진 6

사진 7

사진 8

사진 9

사진 10

사진 11

사진 12

AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN, α -1-ANTICHYMOTRYPSIN, FIBRONECTIN, TRANSGLUTAMINASE IN INFLAMMED GINGIVA

Jae-hyun Kim, Hyung-keun Yoo, Seong-ho Kim, Hyung-shik Shin
Dept. of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

Recently, available interests concerning the biologic significance of the extracellular matrix and proliferating cells associated with periodontal disease has been increased. The distribution or expression of cellular proliferation by PCNA, macrophage detection by α -1-antichymotrypsin, fibronectin playing a important role in host defence mechanisms indirectly, and transglutaminase that cross linked to fibronectin and stimulate fibrin stabilization were studied in inflamed and healthy gingiva. The excised tissue samples were fixed neutral formalin for 24 hours, embedded with paraffin, sectioned at 4–6 μ m in thickness, and immunohistochemically processed by LSAB method.

The positive reaction to PCNA was localized in the suprabasal and basal layer of inflamed gingiva and an increasing reactivity was observed than healthy gingiva. α -1-antichymotrypsin positive cells were localized in the basal layer of inflamed gingiva, and there was no or rare positive cells in healthy gingiva. The positive reaction to fibronectin in inflamed gingiva was more than healthy gingiva, and shown in the connective tissue subjacent to basement membrane of epithelium and in the periphery of the collagen fiber bundles. The positive cells by transglutaminase in inflamed gingiva were noted in suprabasal, spinous, and keratin layer of epithelium, and slightly increased in the capillaries of connective tissues.

But the results of this study demonstrated in vitro reaction. Therefore, the role of PCNA, α -1-antichymotrypsin, transglutaminase, fibronectin and coefficient with other growth factor and extracellular matrix were further investigated in vivo.