

상아질 손상 후 흰쥐 대구치 치수의 calcitonin gene-related peptide (CGRP) 함유 신경섬유 분포에 관한 연구

문주훈 · 박상진 · 민병순 · 최호영 · 최기운
경희대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

A STUDY ON THE DISTRIBUTION OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE CONTAINING NERVE FIBERS IN RAT PULP FOLLOWING DENTINAL INJURY

Joo-Hoon Moon, Sang-Jin Park, Byung-Soon Min, Ho-Young Choi, Gi-Woon Choi
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Kyung-Hee University

The purpose of this study was to investigate the distribution of calcitonin gene-related peptide containing nerve fibers in rat pulp after dentinal injury by means of immunohistochemistry and confocal laser scanning microscope.

The Spague-Dawley rats weighing about 250-300gm were used. The animals were divided into normal control and experimental groups. Experimental animals were sacrificed 1, 2, 4, 7, 10, 21 days after dentinal injury (dentin cutting, and then acid etching with 35% phosphoric acid) on the maxillary molar teeth. The maxillary teeth and alveolar bone were removed and immersed in the 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4), then were decalcified with 15% formic acid for 10 days. Serial frozen 50 μ m thick sections were cut on a cryostat. The rabbit CGRP antibody was used as a primary antibody with a dilution of 1:2000 in 0.01M PB. The sections were incubated for 48 hours at 4 $^{\circ}$ C, and placed into biotinylated anti-rabbit Ig G as a secondary antibody with dilution of 1:200 in 0.01M PB and incubated in ABC(avidin-biotin complex). The peroxidase reaction was visualized by incubating the sections in 0.05% 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.02% H₂O₂.

For the confocal laser scanning microscopic examination, Primary antibody reaction was same as immunoperoxidase staining, but fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugate anti-rabbit IgG as a secondary antibody was used. The confocal laser scanning microscope was used for the examination. A series of images of optical sections was collected with a 20x objective at 3 μ m intervals throughout the depth of specimen. FITC fluorescence was registered through a 488nm and 568nm excitation filter, and images were saved on optical disk. The stereoscopic images and three dimensional images were reconstructed by computer software, and then were analyzed.

The results were as follows :

1. In normal control group, CGRP containing nerve fibers were coursed through the root with very little branching, and then formed a dense network of terminals in coronal pulp.
2. A slight increase in CGRP containing nerve fibers at 1 and 2 day postinjury was noted subjacent to the injury site. In the 4 day group, there were an extensive increase in the number of reactive fibers, followed by a partial return toward normal levels at 7~10 day postinjury, and return by 21 days.
3. The sprouting of the CGRP containing nerve fibers was evident within 2 day after dentinal injury, and by

4days there was a maximal increased, but was decreased at 7days and returned to normal 10~21 day postinjury.

4. In confocal laser scanning microscopic examination, the distinct distribution pattern and sprouting reaction of CGRP containing nerve fibers were observed in stereoscopic images and three dimensional images.

These results suggest that CGRP containing nerve fiber can be important role in the response to dental injury and pain regulation.

I. 서 론

치수는 많은 신경섬유를 함유하며, 그중에서 감각섬유가 대부분을 차지하고 있다¹⁻⁴⁾. 이들이 일차적으로 받아들이는 감각은 통각으로 정상상태에서는 유해수용성의 역치를 넘는 자극을 거의 받지 않고 치수동통을 경험하지 않는 반면 염증상태일 경우에는 정상적인 열, 기계적, 삼투압 작용에도 심한 동통을 경험할 수 있다. 따라서 염증과정과 치수신경 사이의 관계를 이해하므로써 치과치료와 동통에 대한 임상적 조절에 효과적으로 대처할 수 있다.

치아의 신경분포에 관한 연구에서^{5,6)}, 신경섬유들은 주로 삼차신경의 구심성 감각신경과 상경신경절에서 기원된 교감신경의 분지이며, 이들은 결합조직의 신경초로 둘러싸인 유수와 무수 축삭돌기의 다발로 치수내로 들어가 치근을 통과하여 치관부 치수에서 많은 가지들로 분지되고, 상아질내 0.1-0.2mm에서 끝나며, 크기에 따라 C 섬유 (0.1-1.0 μ m), A- δ 섬유 (1-5 μ m), A- β 섬유 (6-10 μ m)로 분류되고 있다⁷⁾. 치아의 신경분포에 관한 연구방법중 면역조직화학적방법은 neurofilament protein^{2,8)} 이나 calcitonin gene-related peptide (이하 CGRP로 명명)와 substance-P (이하 SP로 명명)^{3,4,9,10)} 같은 감각 신경펩타이드에 대한 항체를 사용하는 방법으로서, CGRP에 대한 항체는 조직이 관류고정 되었을 경우 상아질에서 얇은 신경섬유들의 종단을 잘 나타내므로 면역조직화학적방법에 주로 이용되고 있다.

신경펩타이드는 신경계통에서 신경전달물질(neuro-transmitter)이나 신경조절물질(neuromodulator)로 작용하며 현재까지 30여종이 알려져 있다. 이중에서 CGRP는 1982년 Amara등¹¹⁾에 의해 발견되었으며, 37개의 아미노산으로 이루어진 신경전달물질로서 calcitonin gene의 전사중에 mRNA의 변화된 과정에 의해 발현되는 것으로 알려져 있다¹²⁾. CGRP는 척수후근신경절, 삼차신경절등의 1차 구심성신경원 뿐 아니라 상경신경절등에서 발견되고¹³⁻¹⁵⁾, 치수¹⁰⁾, 치주조직¹⁰⁾, 혀^{16,17)}등의 말초신경섬유에도 널리 분포되며, 특히 통증을 전달하는 무수초신경섬유(C 섬유)와 작은 수초신경섬유(A δ 섬유)에 존재하므로써 SP와 같이 통각의 전도에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정하고 있

다. 또한 CGRP는 혈관확장 작용, 대식세포와 백혈구의 기능조절 및 염증반응 및 창상치유에 관계가 깊은 것으로 보고되고 있다^{1 10 17-19)}.

CGRP는 치수의 신경섬유에서 가장 많고^{3,4,9)} SP, neurokinin A와 같은 신경펩타이드와 공존하고 있는것으로 알려져 있으며^{3,4)}, 치아에서 발견된 다른 신경펩타이드로 vasoactive intestinal peptide (VIP)²⁰⁾, peptide histidine isoleucine amide²⁰⁾, neuropeptide-Y (NPY)²¹⁾, somatostatin²²⁾등이 보고되었다. CGRP, SP, neurokinin A를 포함한 치수 감각섬유군들에 관한 연구에서^{1,8)}, 이들이 치수혈관을 따라 치관부 치수와 상아질에 분포하며, 혈류를 변화시키고, 염증 및 면역반응과 결합조직 세포에 영향을 끼치는 것으로 밝혀졌다.

치아손상에 대한 치수신경내 CGRP의 반응을 면역조직화학적방법으로 조사한 선학들의 연구로, Taylor등²³⁾은 상아질에 얇은 5급와동 형성 후 CGRP면역반응 신경섬유의 분포를, Kimberly와 Byers¹⁰⁾는 치수와 치근단농양 주위에서의 CGRP면역반응 신경섬유의 반응을 조사하였고 Sato등²⁴⁾은 흰쥐 치수에서 CGRP양성 신경섬유의 초미세구조를 전자현미경으로 관찰하여 보고하였다. 또한 Khayat등²⁵⁾, Byers등^{26,27)}은 치수노출시의 치수 및 치근단 조직반응에 대하여, Taylor와 Byers²⁸⁾는 치경부 와동형성과 산부식후 생존치수에서 CGRP함유 신경섬유의 발아를, Byers²⁹⁾는 신경발아의 점차적인 감소와 인접 신경세포 표현형에서의 영구적변화를 보고하였다. 반면 Grutzner등³⁰⁾은 교합면에 중등도의 손상을 가한후 면역방사선 방법으로 연구하여 균질화된 치수에서 CGRP와 SP의 감소를 보고한 바 있다.

면역조직화학적방법에서는 특정한 항원의 위치를 알아보기 위하여 일반적으로 광학현미경, 형광현미경 및 전자현미경을 사용하였으나, 최근에는 광학현미경의 기본틀에 형광장치를 부착하고 레이저선을 광원으로 이용하여 원하는 지점에 광원인 레이저와 검출기의 초점을 동시에 일치시켜 초점에 벗어난 상에 의한 산란현상을 최소화하여 상의 선명도를 높이므로써 다양한 종류의 정보를 얻을 수 있는 공초점 레이저 주사현미경이 개발되어 의학 및 생물학 등의 분야³¹⁻³⁶⁾에 널리 이용되고 있다. 특히 생물학 분야에서는 FITC

(fluorescein-5-isothiocyanate)나 rhodamine, Fluo-3과 같은 다양한 형광 물질의 개발로 세포내 칼슘 이온 농도, pH변화를 살아 있는 세포에서 측정할 수 있으며 조직 염색을 이용한 생체세포내 구조물의 형태적 변화, 염색체분석, 세포간의 신호 전달의 가시화, 면역화학적 표지를 통한 면역계의 연구등이 가능하였다³¹⁻³⁵⁾. 치의학분야에서 공초점레이저 주사현미경은 치아경조직³⁶⁻³⁹⁾, 치태⁴⁰⁾, 삼차신경절⁴¹⁾ 등의 연구에 주로 이용되고 있으나 치수신경에 대한 연구^{41,42)}는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 상아질손상후 치수신경 섬유에서 가장 많이 존재하며 통각의 전도 및 손상에 대한 조직의 치유 과정에서 염증반응의 매개체 역할을 하는 것으로 알려진 CGRP함유 신경섬유의 분포를 조사하여 손상에 대한 치수의 반응정도를 규명하고자, 흰쥐 대구치의 교합면을 절삭하여 상아질을 노출시키고 35% 인산으로 산부식을 시행하여 상아질에 손상을 가한후, 시간경과에 따른 치수내 CGRP함유 신경섬유의 분포변화를 면역조직화학적방법과 공초점레이저 주사현미경으로 조사하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

체중 250-300g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 40마리를 암, 수 구별 없이 사용하였으며, 그 중에서 정상 대조군에 4마리, 실험군 (상아질손상 후 1일, 2일, 4일, 7일, 10일, 21일경과군)에 각 6마리씩 36마리를 배정하였다.

면역조직화학적 관찰을 위하여 일차항체 및 이차항체로 rabbit anti CGRP와 biotinylated antirabbit IgG (Sigma Ca, U.S.A.)를 사용하였고, ABC (avidin-biotin complex) kit (Vector Laboratory, U.S.A.)를 이용하여 염색하였다.

공초점레이저 주사현미경 관찰에서 이차항체로 FITC-conjugated antirabbit IgG (Sigma Ca., U.S.A.)를, 공초점레이저 주사현미경은 Leica TCS NT (Leica, Ca, Germany)를 이용하였다.

2. 실험방법

1) 상아질 손상 및 조직처리

정상대조군의 4마리는 치아에 손상을 가하지 않았으며, 실험군의 36마리를 ketamine (0.6ml/200g)으로 전신마취하고 상악 우측 대구치의 교합면을 고속 핸드피스 No. 1 round bur로 약 0.75mm 절삭하고 35% 인산으로 30초간 산부식하여 상아질손상을 가한 후, 상아질면이 노출된 상태

로 실험기간 동안 구강내에 방치하였다.

실험군의 36마리는 상아질에 손상을 가한 후 1일, 2일, 4일, 7일, 10일, 21일째에 ketamine (0.6ml/200g)으로 마취하여 흉강을 열고 좌심실에 삽관을 삽입한 다음, heparin 이 함유된 식염수를 관류하고 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer를 200~300ml 사용하여 관류 고정 하였으며, 정상대조군은 실험군과 동일한 과정으로 처리하였다. 정상대조군과 실험군의 상악 우측 대구치부를 악골과 함께 적출하여 4℃의 동일 고정액에 24시간 후고정하고 15% 개미산으로 10일간 탈회하였다. 냉동절편의 제작을 위하여 4℃의 30% sucrose에 12시간 방치한 후, O.C.T. compound에 포매하여 -20℃의 Cryostat에서 50µm의 두께로 박절하여 염색시까지 저장용액에 보관하였다.

2) 면역조직화학적 염색

조직절편을 multiwell plate에 넣어 0.1M phosphate buffer(PB)로 2분간 3회 가볍게 흔들며 수세한 후, 내인성 과산화효소의 활성을 제거하기 위해 0.9% H₂O₂로 20분 처리하고 0.1M phosphate buffer(PB)로 2분간 3회 수세하였다. 결합항체의 비특이적 반응을 방지하기 위해 10 % normal goat serum (0.1% Triton-X 100 in 0.01M PBS)에서 20분 반응시켰다. 일차항체로 rabbit anti CGRP (1 : 2000 in 0.01M PBS)를 사용하여 4℃에서 48시간 반응시키고 0.1M phosphate buffer(PB)로 2분간 3회 수세하였다. 이차항체로는 biotinylated antirabbit IgG (1:200 in 0.01M PBS)를 사용하여 실온에서 30분 반응시켰다. 다시 0.1M phosphate buffer (PB)로 2분간 3회 세척한 후, ABC (avidin-biotin complex)로 실온에서 30분 반응시키고, 0.05% 3, 3 diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)로 발색하였다. 그후 탈수 및 투명과정을 거쳐 glycerol로 봉입한 후, 광학현미경 (Olympus BHS 313, Olympus Co., Japan)하에서 CGRP함유 신경섬유의 분포부위 및 염색정도를 관찰하였다.

3) 면역형광염색 및 공초점레이저 주사현미경관찰

일차항체까지의 반응과정은 면역조직화학적염색 과정과 동일하며 이차항체로 FITC- conjugated antirabbit IgG를 실온에서 1시간동안 반응시키고 glycerol과 PBS의 9:1 혼합액으로 봉입하였다.

공초점레이저 주사현미경(Leica TCS NT, Leica, Ca, Germany)에서 FITC 관찰을 위한 필터를 장착하고 표본의 위에서 부터 3.0µm 간격으로 16개의 광학적 절편을 형성하고 이를 층별로 조사하여 optical disk에 저장하였다. 저장된 광학적 절편을 컴퓨터 프로그램으로 재구성하여 입체상 및 삼차원상을 형성하고 Polaroid ProPalette 8000으

로 촬영하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 정상대조군

1) 면역조직화학적염색 소견

치근부에서 CGRP함유 양성신경섬유(이하 양성섬유)가 가지를 내지않고 치아 장축을 따라 평행하게 주행한 다음, 치근-치관 경계부의 치관부치수에 도달 해서 약간의 수지상의 분지를 내어 주행한 후, 치관 및 치수우각 부위의 조상아세포층 하방의 subodontoblastic plexus (Raschkow plexus)에서 망상형태의 분포를 보였다 (Fig. 1, 2). 조상아세포층 하방의 양성섬유의 분포는 치수우각 하방에서 가장 많았고, 치근부 쪽으로 향할수록 감소하였다 (Fig. 2).

2) 공초점레이저 주사현미경 소견

subodontoblastic plexus에서 양성섬유의 분포양상은 신경총과 평행하게 분포하고 있었으며, 조상아세포 사이를 지나 상아세관내로 주행하는 양성섬유는 관찰되지 않았다 (Fig. 3, 4).

2. 실험군

1) 1일 경과군

(1) 면역조직화학적염색 소견

상아질손상후 1일째에 양성섬유가 손상하부의 치관부 치수에서 증가하나 그 차이는 미약하였다 (Fig. 5).

(2) 공초점레이저 주사현미경 소견

조상아세포층 하방의 신경총에 접한 혈관의 확장이 관찰되었다 (Fig. 7). 또한 양성섬유는 혈관벽을 따라 평행하게 주행하며 조상아세포 사이로 들어가는 양성섬유는 관찰되지 않았다 (Fig. 6, 7).

2) 2일 경과군

(1) 면역조직화학적염색 소견

치근부 치수의 혈관이 확장된 소견을 보였으며, 확장된 혈관 주위를 따라 주행하는 신경섬유에서 증가된 양성섬유의 소견을 보이기 시작했다 (Fig. 10). 손상하부의 조상아세포층 하방에서 1일군과 비교하여 양성섬유의 발아가 증가된 분포를 보였으며 특히 치수우각 부위에서 양성섬유의 반응도가 가장 많이 나타났다 (Fig. 9). 치수강 부위에서는 1일군과 비교하여 양성섬유의 발아 및 분포에 차이가 없었으나 반응도는 강하게 나타났다 (Fig. 8).

심한 손상으로 인한 급성염증 소견을 보이는 일부의 표본

에서 병소부의 경계는 구분이 되나 섬유성막은 관찰되지 않았으며, 병소의 경계부위에서 양성섬유 발아의 차이도 관찰되지 않았다 (Fig. 11).

(2) 공초점레이저 주사현미경 소견

조상아세포층 하방의 신경총에서 1일군보다 증가된 양성섬유의 발아가 관찰 되었고, 조상아세포 사이를 지나 치수-상아질 경계부까지 분포하는 신경섬유에서 양성섬유가 관찰되었으나 상아세관에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 12, 13).

3) 4일 경과군

(1) 면역조직화학적염색 소견

치관부 치수에서 양성섬유의 분포는 치밀하고 진하게 염색된 망상구조와 현저한 양성섬유의 발아를 보였고, 광범위한 신경발아 부위에서 혈관의 확장을 보였으며 (Fig. 14, 15, 17), 치수강 천정부위에서 조상아세포층을 지나 상아질에 접한 양성섬유가 관찰되었다 (Fig. 15).

손상이 가해진 부위 하방 치수강에서 신경 발아의 양상은 많은 구슬모양의 형태를 보였고 조상아세포층 하방으로 양성섬유의 발아가 형성되었다 (Fig. 16).

(2) 공초점레이저 주사현미경 소견

subodontoblastic plexus에서 많은 양성섬유의 발아를 보였고 (Fig. 20, 23), 신경총 하방의 큰 혈관벽을 따라 망상으로 분포하는 양성섬유가 구슬모양의 발아를 보였다 (Fig. 23). 많은 양성섬유가 신경총에서 분지하여 조상아세포층을 지나 치수-상아질 경계부까지 주행하였고, 일부의 양성섬유는 상아세관속으로 침투하여 분포하였다 (Fig. 23).

4) 7일 경과군

(1) 면역조직화학적염색 소견

양성섬유의 분포가 4군에 비하여 감소하기 시작하였으나 차이는 미약하였고, 치수강 부위에서 혈관이 확장된 소견을 보이며 (Fig. 26, 27), 치수강 부위에서 구슬모양의 발아는 4일군에 비해 상당한 감소를 보였다 (Fig. 27). 심한 손상으로 인해 치수우각 하방에 농양이 형성된 경우, 병소주위로 섬유성 피막은 형성되지 않았으며, 발아섬유들이 병소주위에 망상으로 분포하고 일부는 통과하여 분포하였다 (Fig. 28).

(2) 공초점레이저 주사현미경 소견

subodontoblastic plexus에서 양성섬유의 반응도 및 분포는 4일군과 비해 현저히 감소된 소견을 보였으며, 하방의 혈관벽을 따라 주행하는 양성섬유에서도 발아가 감소된 소

견을 보였다 (Fig. 30, 31). 신경총에서 분지하여 조상아세포층을 지나는 양성섬유의 수가 감소하였고 상아세관으로 침투한 섬유에서 CGRP 양성섬유는 관찰되지 않았다 (Fig. 31).

5) 10일 경과군

(1) 면역조직화학적염색 소견

치수강에서 양성섬유의 분포는 7일군과 비교하여 현저히 감소하였고, 발아는 관찰되지 않았으며 확장된 혈관 또한 정상 소견을 보였다 (Fig. 32).

손상이 심하여 치수강내에 농양이 형성되고 비가역적 반응으로 치근단 부위에 농양이 형성된 경우, 양성섬유들이 초기 농양의 주위를 따라 병소부위를 둘러싸며 평행하게 주행하였다 (Fig. 33).

(2) 공초점레이저 주사현미경 소견

양성섬유가 조상아세포층 하방에서 평행하게 분포하고 있었으며, 조상아세포 사이를 통과하는 양성섬유는 관찰되지 않았다 (Fig. 34, 35).

6) 21일 경과군

- 면역조직화학적염색 소견

정상군에서와 같이 치수강의 양성섬유 분포는 미약하였으며, 확장되었던 혈관 또한 정상으로 관찰되었다 (Fig. 36).

IV. 총괄 및 고안

신경계에는 모든 정보전달의 기본이 되는 여러가지 신경 전달물질이 존재하며 이들이 염색될 수 있음이 알려진 후^{43,44}, 이를 이용하여 신경계의 복잡한 구성을 이해하고자 노력해 왔다. 신경펩타이드는 신경계통에서 신경전달물질이나 신경조절물질로 작용하며, 현재까지 neurofilament protein(NFP)⁴⁵, neuron specific enolase(NSE)⁴⁶, protein gene product 9.5(PGP9.5)⁴⁷, Substance-P(sub-P)^{46,48}, CGRP^{46,48,49}, vasoactive intestinal polypeptide(VIP)^{20,46}, Neuropeptide-Y (NP-Y)^{21,48}, peptide histidine isoleucine amide(PHI)²⁰, nerve growth factor(NGF)⁵⁰등의 여러 신경펩타이드가 발견되어 면역조직화학적방법을 이용하여 연구되고 있다^{2,7,8,24,48,50}. 이 중에서 calcitonin gene-related peptide(CGRP)는 calcitonin과 같은 유전자에서 alternative RNA processing에 의해 발현되는 37개의 아미노산으로 이루어진 신경펩타이드로서^{11,12} 이를 함유한 신경종말이 여러 말초신경에 분포하고⁴⁴, 통각을 전달하는 C섬유와 A δ 섬유에만 존재하며 삼차신경절이나 척수신경절의 신경원에서 발견되는¹⁵ 일차구심성 섬유의 특수한 신경펩타이드인 것으로 보아 통각의 전도에 중

요한 역할을 담당할 것으로 시사되고 있다^{11,51-54}. 또한 혈관 확장 작용¹⁷, 대식세포와 백혈구의 기능조절¹¹, 염증반응 및 창상치유에 관계가 깊은 것으로 보고되고 있다^{10,17-19}.

치아손상 정도에 따라 다양한 치수반응이 유발되는 바, 치수세포에 대한 얇은 상아질 와동형성의 영향은 상대적으로 미약하여 조상아세포들이 생존하고²³, 깊은 상아질 와동형성 또는 산부식과 같은 중간정도의 손상시에는 조상아세포가 상실되고 미세농양이 형성되나, 대부분의 경우에서 조직이 치유되고 수복상아질이 형성된다^{28,29}. 또한 치수노출층의 심한손상시 비가역성의 치수염과 괴사가 발생한다²⁵⁻²⁷. 이에 본 연구에서는 상아질을 삭제하고 산부식을 하여 상아질에 손상을 가하였을 때, 치수의 반응정도를 규명하고자 치수 신경섬유에서 가장 많이 분포하고 국소적 치수손상에 의해 형태 및 분포양상이 변하므로써 조직손상과 치수에 있어 염증반응의 매개체 역할을 하여 염증과정에 역할을 하는 것으로 알려진 CGRP함유 신경섬유의 상아질손상후 시간에 따른 분포변화를 면역조직화학적 방법과 공초점레이저 주사현미경을 이용하여 조사하였다.

치수신경에 관한 연구에서 Plackova⁵⁵와 Arai⁵⁶는 silver stain을, Lilja⁵⁷등은 투과전자현미경을 이용하여 사람치수에서 손상 정도에 따른 신경반응에 관하여 보고한 바 있으나, Luthman²⁰등은 사람치수에서 CGRP에 반응하는 신경섬유는 많지 않음을 보고하고 이는 발치하는 동안의 신경손상이나 동물치아에서의 관류고정만큼 빠르지 못한 사람치수의 immersion fixation으로 인한 신경펩타이드의 손실 때문으로 추정하였다. 이에 본 연구에서는 국소적 감염이 쉽게 유도되고 신경분포가 잘되어 있는 흰쥐 대구치를 이용하여 상아질손상후 치수내 CGRP함유 신경섬유의 분포변화를 관찰하였다.

본 연구에서 정상대조군의 CGRP양성 신경섬유 분포는 치근부치수에서 가지없이 치아장축에 평행하게 주행한 후, 치근-치관 경계부에 도달시 약간의 수지상의 분지를 형성하였으며, 치관 및 치수우각 부위의 조상아세포층 하방의 subodontoblastic plexus (Raschkow plexus)에서 망상 형태의 분포를 보여, Taylor등²³, Taylor와 Byers²⁸, Kimberly와 Byers¹⁰, Khayat등²⁵의 정상대조군 소견과 일치한 반면, 정상대조군, 1일 및 2일경과군에서 상아세관 내로의 신경섬유 침투가 관찰되지 않아 일부 신경섬유들이 조상아세포층과 전상아질을 통과하여 상아질 내로 약 0.1 mm까지 상아세관을 따라 존재한다고 한, Khayat등²⁵, Kimberly와 Byers¹⁰의 보고 및 전자현미경 연구에서 산부식과 와동탈수후 상아질내로 신경섬유의 함입이 관찰되었다고 한 Lilja⁵⁷의 보고와 차이를 보였다.

본 연구에서 1일과 2일경과군의 CGRP양성 신경섬유는 손상하부의 치관부 치수에서 확장된 혈관주위에서 증가하였고, 4일경과군의 치관부 치수에서 치밀하고 진하게 염색

된 망상구조와 혈관의 확장 및 현저한 양성 신경섬유의 증가소견을 보인 바, 이는 흰쥐 상악 제1대구치 근심치근에 5급와동을 형성시, 1일 째에 CGRP면역반응 신경섬유가 손상하부에서 약간 증가하고 4일째에 광범위한 증가를 보였다는 Taylor등²³⁾의 보고와 유사한 분포양상을 보였다. 한편 Sato⁴⁵⁾는 NFP면역반응에서 축삭의 용기나 구슬모양의 발아양상은 발육중이거나 재생과정중에 주로 많이 나타나고 이들 용기부분에 신경전달물질과 같은 것이 저장되어 성장 발육과 관련된다 주장하였다. 그러나 Grutzner등³⁰⁾은 교합면에 중등도의 손상을 가한 후 흰쥐 대구치 치수를 면역방사선학적으로 평가하여 연구한 결과, 손상후 3~10일 사이에 균질화된 치수에서 CGRP는 45%, SP는 10% 감소하여 본 연구와는 상반된 결과를 보고한 바, 향후 이들 두 방법을 이용한 실험들 사이의 차이에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Taylor등²³⁾은 상아질 손상후 7일째에 급성 염증반응의 감소와 수복상아질의 형성 및 CGRP양성 신경섬유의 발아가 나타났고, 11~21일에 치수의 병리와 치유의 정도에 상당한 변화가 일어나며 대조군 및 4~11일군, 21~35일군간의 CGRP양성 신경섬유 증가에 현저한 차이가 있음을 보고하였으나, 본 연구에서는 7일경과군에서 양성섬유의 분포가 4일경과군에 비하여 미약한 차이로 감소하기 시작하여 10일경과군에서 현저히 감소하고 21일경과군에서 정상대조군과 유사한 분포 양상을 관찰할 수 있었다. 본 연구에서 10일경과군의 양성섬유의 분포가 거의 정상에 가깝게 나타난 것은 심한 손상으로 인한 경우를 제외하고는 중간정도의 다소 약한 손상을 가하였고 증식하는 감각섬유들이 치수회복 동안에 더 정상적인 분포양상으로 되돌아 오는 능력을 보인 것으로 사료된다.

신경섬유의 발아는 자극으로 인하여 이전의 신경섬유로부터 새로이 발생된 섬유 즉 기존의 섬유에서 양성반응을 나타내는 섬유와 발아섬유를 함께 일컫는 말이다. 본 연구에서는 손상후 2일째에 조상아세포층 하방에서 1일경과군과 비교하여 증가된 양성 신경섬유 및 발아섬유의 분포를 보이기 시작하여, 4일경과군에서는 치밀하고 진하게 염색된 망상구조와 손상이 가해진 부위의 하방 치수강에서 많은 구슬모양의 신경섬유 발아양상을 보였으며 조상아세포층 하방으로 많은 양성섬유의 발아가 형성되었다. 그러나 7일경과군에서 상당한 감소가 나타나기 시작하여 10일과 21일경과군에서는 발아가 관찰되지 않았다. 이는 흰쥐 대구치에 5급와동을 형성한 치아손상시 염증세포의 침입없이 손상에 인접한 치수에서 신경의 가역적인 발아가 18~24시간에 나타나 3~4일에 가장 많았으며 6~7일에 정상으로 돌아왔다고 한 Taylor등²³⁾의 보고 및 흰쥐에서 치수노출은 점진적으로 비가역성 치수염과 괴사를 유발하지만 발아신경 섬유는 생존 생활치수에서 계속적으로 관찰되었다고한 Kimberly

와 Byers¹⁰⁾ 및 Khayat등²⁵⁾의 보고와 일치하였다. 또한 Taylor와 Byers²³⁾도 흰쥐에서 치경부에 5급와동을 형성하고 산부식 처리하여 중등도의 손상을 가한 후, 가장 큰 신경섬유 발아는 4일후에 발생하였으며 3~5주에 정상으로 회복됨을 관찰하여 유사한 연구결과를 보고한 바 있다. 이외에도 Swift와 Byers⁵⁸⁾은 흰쥐에서 가령에 따른 치수염증에 대한 신경섬유의 반응을 연구하여 치경부 5급 와동형성 4일후에 CGRP와 SP의 발아를 관찰함으로써 염증반응의 매개체로서의 신경펩타이드 역할을 추정하였고, Sato⁴⁵⁾는 neurofilament staining을 이용하여 흰쥐 대구치 치관에서 얇은 상아질 손상을 가하였을 때 조상아세포층에 약한 손상이 가해지나 치수가 빨리 일어났으며, 신경발아는 손상부 근처에서 관찰되었다고 하였다. 손상하부에서 양성섬유 발아의 역할에 대해 명확히 규명되지는 않았으나, 더 많은 양의 CGRP가 조직손상 부위로 이동하게 하는 기전일 수 있으며 CGRP함유 신경섬유의 증식 또는 정상적으로는 펩타이드를 함유하지 않는 신경말단에서의 CGRP 표현으로 사료되며 이는 손상에 대한 치수반응에 있어 중요한 역할 즉 염증반응의 조절기능을 하는 것으로 추정된다.

신경구조와 세포생물학에서의 변화는 치수로 제한되지 않고 근처 치근단 신경대로 확장할 수 있으며, 이러한 변형은 최소 1년간 계속될 수 있다. 본 연구에서도 2일경과군의 손상하부에서 급성염증이 나타났으며 7일경과군의 치수우각 하방에 농양이 형성되고 발아섬유들이 병소주위에 망상으로 분포하였고, 10일경과군에서는 치수강내에 농양이 형성되어 비가역적 반응으로 치근단 부위에 농양이 형성된 경우도 관찰되었다. 이는 상아질을 삭제하는 동안 상아질에 직접적인 손상을 가하거나, 삭제하는 동안 발생하는 열, 인산의 치수에 대한 유해작용, 산부식된 상아질의 상아세관 개방에 의한 세균 침투 및 상아질 절삭시 치수노출이 일어나 치수의 급성염증이 진행되었기 때문으로 생각되며 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

치수에 분포하는 여러 신경펩타이드에 관한 선학들의 연구에서, Wakisaka⁴⁶⁾는 CGRP나 SP를 함유하는 감각신경 섬유들은 치수신경분포의 주성분으로 치수 신경섬유의 약 절반에서 CGRP와 SP가 발견되나 CGRP가 더 많이 나타났다음을 보고하였고, Silverman과 Kruger⁵²⁾, Swift와 Byers⁵⁸⁾, Hong등⁵⁹⁾은 흰쥐 대구치 신경섬유에서 CGRP와 SP를 비교분석하여 SP보다 CGRP를 함유한 섬유가 훨씬 많았으며, CGRP를 함유한 치수축삭들은 더 크고 많으며 작은 유수축삭 크기 범주로 많은 섬유들을 포함한 반면 SP는 구슬모양의 얇은 신경섬유에서 관찰되었다고 하였으며, 고양이에서도 유사한 소견이 보고된 바 있다⁴⁸⁾. 또한 Bonghielm등⁶⁰⁾은 배양된 흰쥐 치수 섬유아세포의 성장에 신경펩타이드가 미치는 영향을 연구하여 SP, NKA, CGRP 순으로 세포수가 증가함을 보고하고 SP, NKA,

CGRP는 치수세포에 대한 성장조절능을 지닌다 하였다. 본 연구에서는 상아질 손상후 치수반응을 연구하기 위하여 시간에 따른 CGRP함유 신경섬유의 분포변화를 조사하였으나, 향후 치수 신경섬유에 존재하는 다른 신경펩타이드의 형태 및 분포양상과 이들 신경펩타이드의 방출 기전등에 대한 연구가 필요할것으로 생각된다.

세포조직 기작을 연구하는데 가장 널리 쓰이는 기기중의 하나인 형광현미경은 초점면 이외에서 오는 산란현상에 의해 해상도가 저하되는 단점이 있어 이러한 한계를 극복하기 위해 개발된 기기가 광원과 렌즈의 초점을 시료의 한지점에 동시에 맞추는 원리를 이용한 공초점레이저 주사현미경이다. 공초점레이저 주사현미경은 광원으로 레이저선을 이용하므로 정교한 초점을 쉽게 형성할 수 있고 표본내부로 투영되어 표본이 여러개의 얇은 단면으로 주사될 수 있다^{36,37)}. 주사된 빛이 사진증폭관에 분석되어 고감도의 수상기에 상을 형성한 후, 컴퓨터 프로그램에 의하여 초점 바깥의 상은 모두 제거되고 초점이 맞는 상만이 나타나 해상력이 매우 높은 선명한 상을 관찰할 수 있으며, 광학적 절편을 이용하므로써 선명한 상과 입체적인 구조의 상을 얻을 수 있다는 장점이 있다^{31, 33, 34, 37)}.

공초점레이저 주사현미경을 이용한 연구에서, Fristad 등⁴¹⁾은 흰쥐에서 하치조신경을 절단하고 삼차신경절핵과 치수 신경섬유에서 VIP 및 SP의 공존을 면역조직화학적 방법과 공초점레이저주사현미경으로 관찰하여 확인하였고, Okiji 등⁴²⁾은 흰쥐치수에서 SP 및 CGRP면역반응 신경섬유와 부세포 사이의 구조적 및 기능적 상관관계를 이중면역형광염색과 공초점레이저 주사현미경으로 조사하여 이들 구조의 근접성을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 또한 Mossberg 등³⁴⁾은 면역형광으로 표지된 축삭중단의 정량분석에 공초점레이저 주사현미경을 이용하여 각 축삭중단의 형광신호 강도를 측정 한 바 있다.

본 연구에서 CGRP 양성 신경섬유를 FITC- conjugated antirabbit IgG로 반응시키고, 공초점레이저 주사현미경에서 16개의 광학적 절편을 형성하여 층별로 조사해 입체상 및 삼차원 영상을 재구성하여 관찰한 결과, 상아질손상후 시간에 따른 CGRP양성 신경섬유의 전반적인 분포양상은 면역조직화학적 염색소견과 차이를 보이지 않았으나 광학현미경으로 관찰시 구분이 불분명했던 부위의 신경섬유 분포 및 발아양상을 명확하게 구별할 수 있었다. 특히 4일 경과군에서 상아세관내에 분포하는 양성섬유가 관찰되었으며, 이는 시료중에서 원하는 지점에 레이저와 검출기의 초점을 동시에 일치시켜 간섭현상을 줄이고 상의 선명도를 최대한 결과로 생각된다. 본 연구의 면역조직화학적 염색소견에서 21일 경과군은 정상대조군과 유사한 양성 신경섬유 분포양상을 보였고, 전반적인 공초점레이저 주사현미경 소견 또한 면역조직화학적 소견과 유사하여 본 연구에서는

21일 경과군의 공초점레이저 주사현미경 관찰을 시행하지 않았다. 이와같이 공초점레이저 주사현미경의 광원인 레이저선이 상아질등의 경조직을 투과할 수 있으므로 치아에서 이용될 수 있는 새로운 형광염색의 개발과 더불어 이를 이용한 치아경조직 및 치수에서의 연구 및 심미재료와 치질과의 접착에 관한 연구가 이루어져야할 것으로 사료된다.

면역조직화학적방법과 공초점레이저 주사현미경을 이용한 본 연구결과와 선행들의 연구를 종합하여 볼 때, CGRP 양성 신경섬유는 상아질 손상초기에 손상하부 주변의 치수에서 증가하고 시간이 지남에 따라 정상적인 신경분포로 되 돌아온 것으로 미루어보아, 말초 감각신경섬유가 정지된 구조라기보다는 국소적 조직상태에 반응하여 그들의 분포형태를 역동적으로 변화시킬 수 있음을 확인할 수 있었으며, 이에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 상아질손상이 치수조직내 CGRP함유 신경섬유의 분포에 미치는 영향을 규명하고자 흰쥐 대구치의 교합면을 절삭하여 상아질을 노출시키고 35% 인산으로 산부식하여 상아질손상을 가한 후, 정상대조군과 상아질 손상 후 1일, 2일, 4일, 7일, 10일, 21일이 경과한 실험군에서 치수조직내 CGRP함유 신경섬유의 시간에 따른 분포변화를 면역조직화학적방법과 공초점레이저 주사현미경으로 관찰·비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CGRP양성 신경섬유의 분포는 정상대조군의 치근부에서 치아장축을 따라 주 행한 후, 치관부에 도달하여 수지상의 분지를 형성하여 망상형태의 분포를 나타냈다.
2. CGRP양성 신경섬유는 1일과 2일 경과군의 상아질손상 직하부에서 증가하기 시작하여 4일 경과군에서 치밀하고 진하게 염색된 망상구조의 현저한 증가를 보였으며, 7일 및 10일 경과군에서 감소하다 21일 경과군에서는 정상대조군과 유사한 분포양상을 나타냈다.
3. CGRP 양성섬유의 발아는 2일 경과군에서 나타나기 시작하여 4일에 가장 현저 하였으며, 7일째에 감소하여 10일 및 21 경과군에서는 관찰되지 않았다.
4. 광학적절단에 의해 재구성된 입체상과 삼차원상을 분석한 공초점레이저 주사현미경 관찰에서, CGRP양성 신경섬유의 분포 및 발아양상을 명확하게 관찰 할 수 있었다.

이상의 결과에서 CGRP양성 신경섬유는 손상에 대한 치수조직의 치유반응에 관여하며 동통조절에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

참고문헌

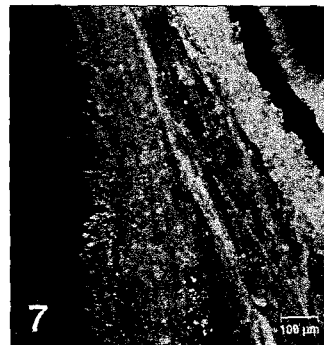
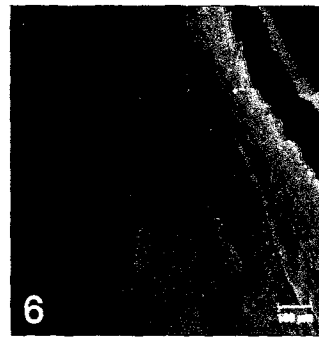
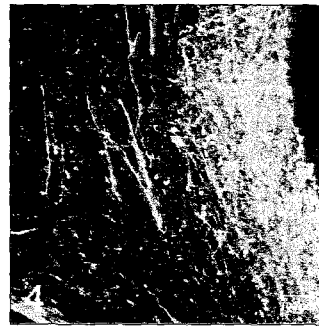
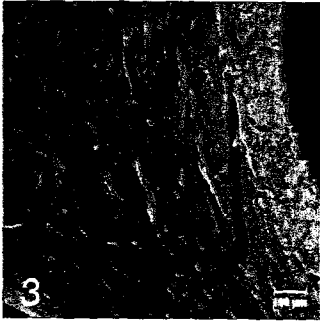
1. Byers M.R. : Dental sensory receptors. *Int. Rev. Neurobiol.*, 25:39-94, 1984.
2. Maeda T., Iwanaga T., Fujita T., Takasashi Y., and Kobayashi S. : Distribution of nerve fibers immunoreactive to neurofilament protein in rat molars and periodontium. *Cell Tissue Res.*, 249:13-23, 1987.
3. Silverman J.D., and Kruger L. : An interpretation of dental innervation based on the pattern of calcitonin gene-related peptide immunoreactive thin sensory axons. *Somatosen. Res.*, 5(2):157-175, 1987.
4. Wakisaka S., Nishikawa S., Matsuo S., Takano Y., and Akai M. : The distribution and origin of CGRP containing nerve fibers in the feline dental pulp. *Histochemistry*, 86:585-589, 1987.
5. Pimenidis M.Z., and Hinds J.W. : An autoradiographic study of the sensory innervation of teeth. I. Dentin. *J. Dent. Res.*, 56:827-834, 1977.
6. Pimenidis M.Z., and Hinds J.W. : An autoradiographic study of the sensory innervation of teeth. II. Dental pulp and periodontium. *J. Dent. Res.*, 56:835-840, 1977.
7. Byers M.R., and Matthews B. : Autoradiographic demonstration of ipsilateral and contralateral sensory nerve endings in cat dentin, pulp and periodontium. *Anat. Rec.*, 201:249-260, 1981.
8. Maeda T., Iwanaga T., Fujita T., and Kobayashi S. : Immunohistochemical demonstration of nerve in the pre-dentin and dentin of human third molar with the use of an antiserum against neurofilament protein. *Cell Tissue Res.*, 243:469-475, 1986.
9. Gazelius B., Edwall B., Olgart L., Lundberg J.M., Hokfelt T. and Fischer J.A. : Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in sensory neurons of cat dental pulp. *Acta Physiol. Scand.*, 130:33-40, 1987.
10. Kimberly C.L., and Byers M.R. : Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *Anatomical Record*, 222:289-300, 1988.
11. Amara S.G., Jonas V., and Rosenfeld M.G. : Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298:240-244, 1982.
12. Rosenfeld M.G., Mernod J.J., Amara S.G., Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Vale W.W., and Evans R.M. : Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature(Lon.)*, 304:129-135, 1983.
13. Baffi J., Gores T., Slowik F., Horvath M., Lekka N., Pasztor E., and Palkovits M. : Neuropeptides in the human superior cervical ganglion. *Brain Res.*, 570:272-278, 1992.
14. Copray J.C.V.M., Ter Horst G.J., Liem R.S.B., and Van Willigen J.D. : Neurotransmitters and neuropeptide within the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat : an immunohistochemical analysis. *Neurosci.*, 37:399-411, 1990.
15. Prins M., Werf F., Baljet B., and Otto J.A. : Calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in the monkey trigeminal ganglion, an electron microscopic study. *Brain Res.*, 629:315-318, 1993.
16. Brain S.D., Williams T.J., Tipins J.R., Morris H.R., and MacIntyre I. : Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 313:54-56, 1985.
17. Kinnman E., and Aldskogius H. : The role of substance P and calcitonin gene-related peptide containing nerve fibers in maintaining fungiform taste buds in the rat after a chronic chorda tympani nerve injury. *Exp. Neurol.*, 113:85-91, 1991.
18. Hegerstrand A., Dalsgaard C.J., Jonzon B., Larsson O., and Nilsson J. : Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3299-3033, 1990.
19. Kjartansson J., and Dlasgaard C.J. : Calcitonin gene-related peptide increases survival of a musculocutaneous critical flap in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 142:355-358, 1987.
20. Luthman J., Luthman D., and Hokfelt T. : Occurrence and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp. *Archs Oral Biol.*, 37:193-208, 1992.
21. Edwall B., Gazelius B., Fazekas A., Theodorsson-Narheim E., and Lundberg J. : Neuropeptide Y (NPY) and sympathetic control of blood flow in oral mucosa and dental pulp in the cat. *Acta. Physiol. Scand.*, 125:253-264, 1985.
22. Casasco A., Calligaro A., Casasco M., Springall D.R., Polak J.M., and Marchetti C. : Immunocytochemical evidence for the presence of somatostatin-like immunoreactive nerves in human dental pulp. *J. Dent. Res.*, 70:87-89, 1991.
23. Taylor P.E., Byers M.R., and Redd P.E. : Sprouting of CGRP nerve fibers in response to dentin injury in rat molar. *Brain Res.*, 461:371-376, 1988.
24. Sato O., Takeuchi-Maeno H., Maeda T., and Takano Y. : Immunoelectron microscopic observation of calcitonin gene-related peptide(CGRP) -positive nerves in the dental pulp of rat molars. *Archs. Histol. Cytol.*, 55(5):561-568, 1992.
25. Khayat B.G., Byers M.R., Taylor P.E., Mecifi K.B., and Kimberly C.L. : Responses of nerve fibers to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by CGRP immunocytochemistry. *J. Endod.*, 14:577-587, 1988.
26. Byers M.R., Taylor P.E., Khayat B.G., and Kimberly C.L. : Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *J. Endod.*, 16: 78-84, 1990.
27. Byers M.R., and Taylor P.E. : Effect of sensory denervation on the response of rat molar pulp to exposure injury. *J. Dent. Res.*, 72:613-618, 1993.
28. Taylor P.E., and Byers M.R. : An immunocytochemical study of morphological reaction of nerves containing calcitonin gene-related peptide to micro abscess forming and healing in rat molars. *Archs Oral Biol.*, 35:629-638, 1990.
29. Byers M.R. : Segregation of NGF receptor in sensory receptors, nerves and local cells of teeth and periodontium demonstrated by EM-immunocytochemistry. *J. Neurocyt.*, 19:765-775, 1990.
30. Grutzner E.H., Garry M.G., and Hargeaves K.M. : Effect of injury on pulpal levels of immunoreactive substance P and immunoreactive calcitonin gene-related peptide. *J. Endod.*, 18:553-557, 1992.
31. Deitch J.S., Smith K.L., Swann J.H., and Turner J.N. : Ultrastructural investigation of neurons identified and localized using the confocal scanning laser microscope. *J. Electromicroscopy Technique*, 18:82-90, 1991.
32. Buwalda J., Colnot D.R., Bleys R.L.A.W., Groen G.J., Thrasivoulou C., and Cowen T. : Imaging and analysis of perivascular nerves in human mesenteric and coronary arteries : a comparison between epi-fluorescence and confocal microscopy. *J. Neurosci. Methods*, 73:129-134, 1997.
33. Green C.R., Peters N.S., Gourdie R.G., Rothery S., and

- Severs N.J. : Validation of immunohistochemical quantification in confocal scanning microscopy : A comparative assessment of gap junction size with confocal and ultrastructural techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 41(9):1339-1349, 1993.
34. Mossberg K., Arvidsson U., and Ulfhake B. : Computerized quantification of immunofluorescence-labeled axon terminals and analysis of colocalization of neurochemicals in axon terminals with a confocal laser microscope. *J. Histochem. Cytochem.*, 38(2):179-190, 1990.
 35. Manders E.M., Stap J., Brakenhoff G.J., Van Driel R., and Aten A. : Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.*, 103:857-862, 1992.
 36. Watson T.F. : Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Br. Dent. J.*, 171:287-291, 1991.
 37. Watson T.F. : Fact and artefact in confocal microscopy. *Adv. Dent. Res.*, 11(4):433-441, 1997.
 38. Kabasawa M., Ejiri S., Hanada K., and Ozawa H. : Histological observations of dental tissue using the confocal laser scanning microscope. *Biotechnic and Histochemistry*, 70:66-69, 1995.
 39. Arends J., Duschner H., and Ruben J.L. : Penetration of varnishes into demineralized root dentin in vitro. *Caries Res.*, 31:201-205, 1997.
 40. Netuschil L., Reich E., Unteregger G., Sculean A., and Brex M. : A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Archs Oral Biol.*, 43:277-285, 1998.
 41. Fristad I., Jacobsen E.B., and Kvinnsland I.H. : Coexpression of vasoactive intestinal polypeptide and substance P in reinnervating pulpal nerves and in trigeminal ganglion neurons after axotomy of the inferior alveolar nerve in the rat. *Archs Oral Biol.*, 42:183-189, 1998.
 42. Okiji T., Jontell M., Belichenko P., Dahlgren U., Bergenholtz G., and Dahstrom A. : Structural and functional association between substance P and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and accessory cells in rat dental pulp. *J. Dent. Res.*, 76(12):1818-1824, 1997.
 43. Hokfelt T., Kellerth J.O., Nilsson G., and Pernow B. : Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neuron. *Brain Res.*, 100:235-252, 1975.
 44. Besson J.M., and Chaouch A. : Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.*, 67:67-186, 1987.
 45. Sato O. : Responses of pulpal nerves to cavity preparation in rat molars : An immunohistochemical study using neurofilament protein (NFT) antiserum. *Archs Histol. Cytol.*, 52(4):433-446, 1989.
 46. Wakisaka S. : Neuropeptides in the dental pulp : Distribution, origins and correlation. *J. Endod.*, 16(2):67-69, 1990.
 47. Ramieri G., Panzica G.C., Viglietti-Panzica C., Modica R., Springall D.R., and Polak J.M. : Non-innervated Merkel cells and Merkel-neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Archs Oral Biol.*, 37(4):262-269, 1992.
 48. Heyeraas K.J., Kvinnsland I., Byers M.R., and Jacobsen E.B. : Nerve fibers immunoreactive to PGP 9.5, CGRP, SP and NPY in the dental pulp, periodontal ligament and gingiva in cats. *Acta Odont. Scand.* 51: 207-221, 1993.
 49. Rodrigo J., Polak J.M., Terenghi G., Cervantes C., Ghatei M.A., Mulderry P.K., and Bloom S.R. : Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive sensory and motor nerves of the mammalian palate. *Histochemistry*, 82:67-74, 1995.
 50. Tsuzuki H., and Kitamura H. : Immunohistochemical analysis of pulpal innervation in developing rat molars. *Archs Oral Biol.*, 36:139-146, 1991.
 51. Ryu P.D., Gerber G., Murase K., and Randic M. : Actions of calcitonin gene-related peptide on rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Res.*, 441:357-361, 1988.
 52. Silverman J.D., and Kruger L. : Calcitonin gene-related peptide immunoreactive innervation of the rat head with emphasis on specialized sensory structures. *J. Comp. Neurol.*, 280:303-330, 1989.
 53. Hokfelt T., Wiesenfeld-Hallin Z., Villar M., and Melander T. : Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neurosci. Lett.*, 83:217-220, 1987.
 54. McNeill D.L., Chung K., Carlton S.M., and Coggehall R.E. : Calcitonin gene-related peptide immunostained axons provide evidence for fine primary afferent fibers in the dorsal and dorsolateral funiculi of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 272:303-308, 1988.
 55. Plackova A. : Pathologic changes in the innervation of the dental pulp during carious process. *J. Dent. Res.*, 45:62-65, 1996.
 56. Arai H. : Neurohistological study on responses of nerve fibers to pulpitis in human teeth. *J. J. Conserv. Dent.*, 34:1631-1646, 1991.
 57. Lilja J., Nordenvall K.J.H., and Brannstrom M. : Dentin sensitivity, odontoblasts and nerves under desiccated or infected experimental cavities. *Swed. Dent. J.*, 6:93-103, 1992.
 58. Swift M.L., and Byers M.R. : Effect of aging on responses of nerve fibers to pulpal inflammation in rat molars analyzed by quantitative immunocytochemistry. *Archs Oral Biol.*, 37:901-912, 1992.
 59. Hong D., Byers M.R., and Oswald R.J. : Dexamethasone treatment reduces treatment reduces sensory neuropeptides and nerve sprouting reactions in injured teeth. *Pain*, 55:171-181, 1993.
 60. Bongenhielm U., Haegerstrand A., Theodorsson E., and Fried K. : Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. *Regulatory Peptides*, 60:91-98, 1995.

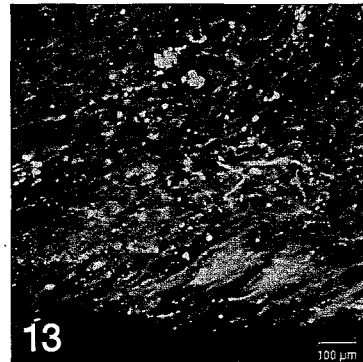
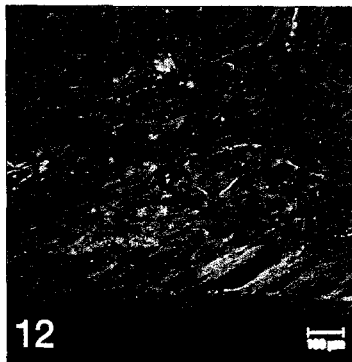
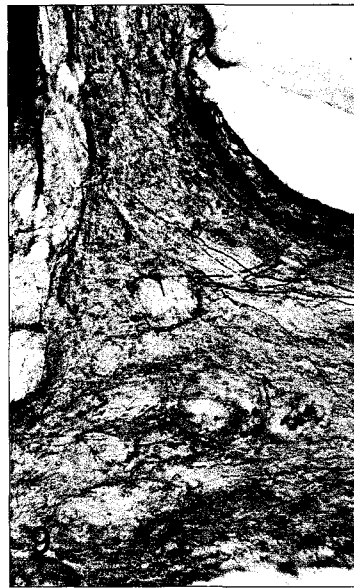
EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in normal control group ($\times 40$)
- Fig. 2. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in coronal pulp of normal control group ($\times 100$)
: CGRP containing nerve fibers course through the root with very little branching, and then form a dense network of terminals in the pulp horn.
- Fig. 3. Confocal laser scanning micrograph of normal control group
- Fig. 4. Stereoscopic image that reconstructed from confocal optical sections
- Fig. 5. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in 1 day postinjury group ($\times 100$)
: In the coronal pulp under injured site, a slight increase in CGRP containing nerve fibers were noted.
- Fig. 6. Confocal laser scanning micrograph of 1 day postinjury group
- Fig. 7. Stereoscopic image that reconstructed from confocal optical sections : CGRP containing nerve fibers were distributed around vasodilated blood vessels.
- Fig. 8. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in pulp horn area of 2 day postinjury group ($\times 100$)
- Fig. 9. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in pulp chamber of 2 day postinjury group ($\times 200$)
: CGRP containing nerve fibers were slightly increased.
- Fig. 10. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in radicular pulp of 2 day postinjury group ($\times 100$)
- Fig. 11. Acute inflammation under injured site of 2 day postinjury group ($\times 100$)
- Fig. 12. Confocal laser scanning micrograph of 2 day postinjury group
- Fig. 13. Stereoscopic image that reconstructed from confocal optical sections
- Fig. 14. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in 4 day postinjury group ($\times 40$)
- Fig. 15. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in pulp chamber of 4 day postinjury group ($\times 100$)
: Numerous CGRP containing nerve fibers have sprouted below the injury and had formed in the underlying odontoblast layer.
- Fig. 16. High magnification of Fig. 15 ($\times 200$)
: CGRP containing nerve fibers were increased in subodontoblastic plexus and odontoblast layer.
- Fig. 17. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in coronal pulp of 4 day postinjury group ($\times 100$)
- Fig. 18. Confocal laser scanning micrograph of 16 optical sections in 4 day postinjury group
- Fig. 19. Top right image of Fig. 18.
- Fig. 20. Stereoscopic image that reconstructed from confocal optical sections
- Fig. 21. Confocal laser scanning micrograph of 16 optical sections in 4 day postinjury group
- Fig. 22. Top right image of Fig. 21
- Fig. 23. Stereoscopic image that reconstructed from confocal optical sections
- Fig. 24. Three dimensional reconstruction image
- Fig. 25. Three dimensional mesh image
- Fig. 26. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in 7 day postinjury group ($\times 40$)
- Fig. 27. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in pulp chamber of 7 day postinjury group ($\times 100$)
: The sprouting of CGRP containing nerve fiber was decreased compared to 4 day postinjury group.
- Fig. 28. Abscess formation area of coronal pulp in 7 day postinjury group ($\times 200$)
: The abscess was not surrounded by fibrous tissue, so that the zone of nerve sprouting contacted it and a few CGRP containing nerve fibers have penetrated into the abscess.
- Fig. 29. Confocal laser scanning micrograph of 16 optical sections in 7 day postinjury group
- Fig. 30. Top right image of Fig. 29
- Fig. 31. Stereoscopic image that reconstructed from confocal optical sections
- Fig. 32. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in 10 day postinjury group ($\times 100$)
- Fig. 33. Periapical abscess formation area in 10 day postinjury group ($\times 200$)
- Fig. 34. Confocal laser scanning micrograph of 10 day postinjury group
- Fig. 35. Stereoscopic image that reconstructed from confocal optical sections
- Fig. 36. Distribution of the CGRP containing nerve fiber in 21 day postinjury group ($\times 40$)
: The distribution of CGRP containing nerve fibers was similar to normal control group.

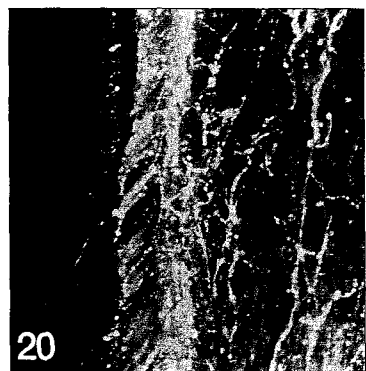
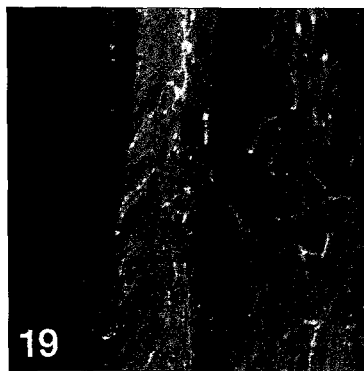
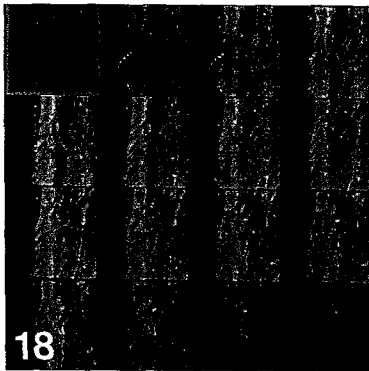
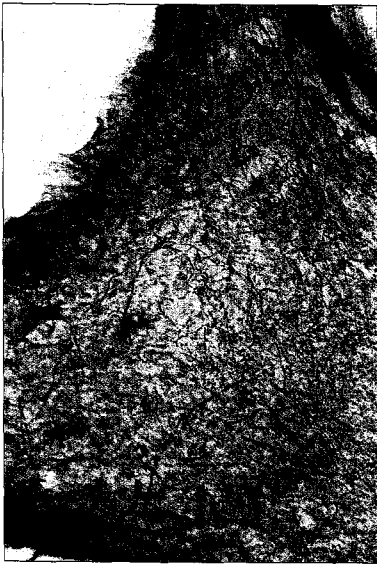
논문사진부도 ①



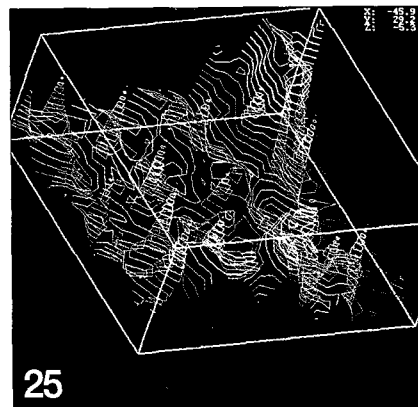
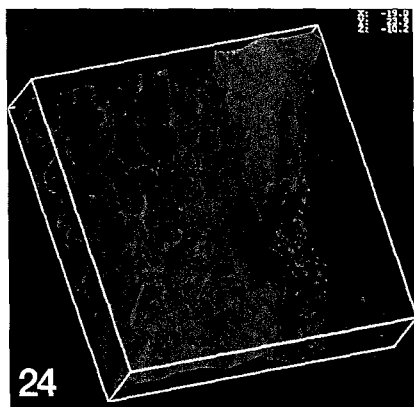
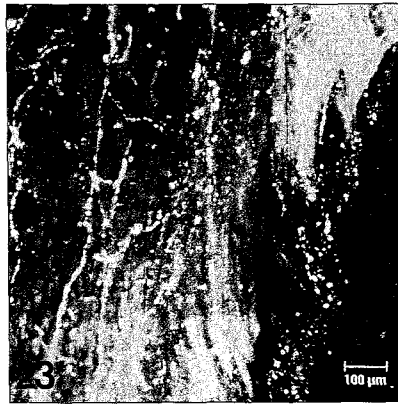
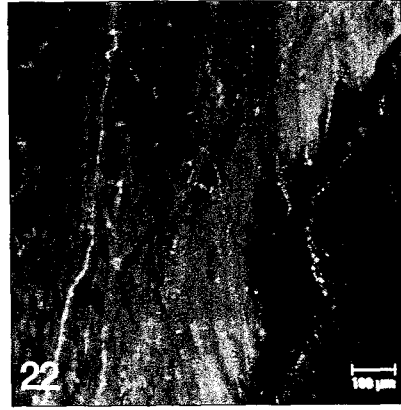
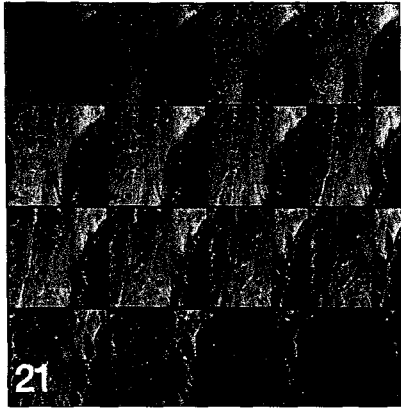
논문사진부도 ②



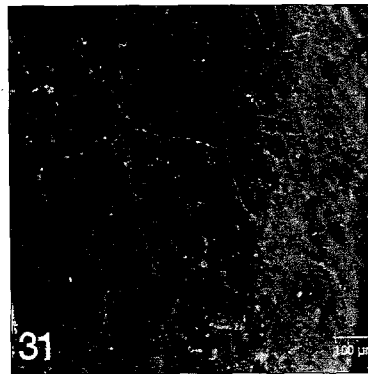
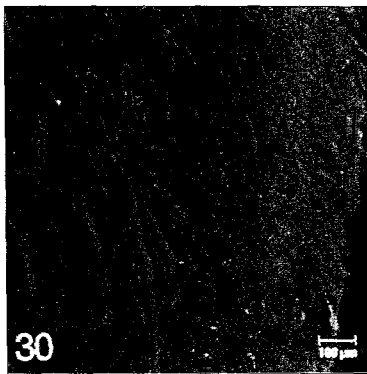
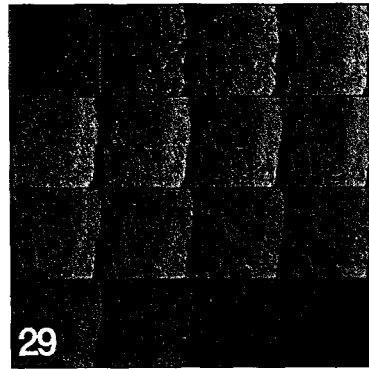
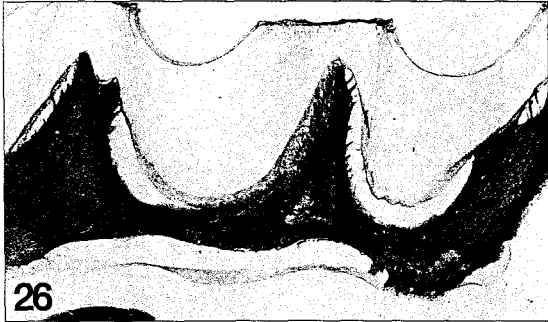
논문사진부도 ③



논문사진부도 ④



논문사진부도 ⑤



논문사진부도 ⑥

