

치근단질환에서 형질전환성장인자-β와 기질금속합유단백분해효소 발현에 관한 연구

지정호 · 이수종

원광대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

A STUDY ON THE EXPRESSION OF TRANSFORMING GRO WITH FACTOR-β AND MATRIX METALLOPROTEINASE-1 IN PERIAPICAL LESION

Jung-Ho Chi, Su-Jong Lee

Department of Conservative Dentistry, School of dentistry, Wonkwang University

The periapical response to injury is a complex interaction of inflammatory, immune, neural, vascular and synthetic activity. TGF-β is a potent modulator of proliferation and differentiation in various tissue, seems to lead to an increase in extracellular matrix.

MMP are a family of proteolytic enzyme that mediate the degradation of extracellular matrix macromolecules, but little is known about their possible role in periapical tissue.

The purpose of this study is to investigate the differential expression of TGF-β and MMP-1 in tooth follicle, periapical abscess, granuloma and cyst. The expression of TGF-β and MMP-1 in periapical tissue was evaluated by immunohistochemical staining and Western blot analysis. Correlation among the periapical lesions were statically analyzed.

The degree of MMP-1 expression in periapical abscess was higher than in any other periapical lesion, and statically significant. TGF-β expression is the prominent in granuloma than other periapical lesion, which was statically significant. The increased expression of MMP and TGF-β was not co-related with inflammatory cell infiltration degree of the periapical cyst. The expression degree of MMP and TGF-β was not co-related with periapical abscess and cyst, but expression of MMP and TGF-β showed strong positive co-relationship with periapical granuloma, which was statically significant.

TGF-β expression by Western blot analysis was prominent in granuloma and cyst, and similar to the results by immunohistochemistry. MMP-1 expression is less than TGF-β, but there is not extreme difference between periapical lesion.

These results suggest that TGF-β and MMP may be involved in tissue remodeling and has an important role in progress or mediation of periapical lesions.

Key Words : Periapical lesion, Inflammatory cell, MMP, TGF-β, Immunohistochemistry, Western blot analysis

I. 서 론

치근단 농양, 육아종, 낭종 등 치근단병소는 치근단 주위 조직에 대한 항원의 지속적인 자극으로 발생한다^{1,2}. 근관

내의 감염원은 치근단 부위를 자극하여 국소적인 염증반응을 일으키며³, 그 결과 발생한 치근단 병소가 적절히 치치되지 않는 경우 세균작용과 조직의 염증으로 치주인대, 상아질, 백악질, 그리고 골조직을 포함한 치주조직을 파괴된다.

II. 연구방법

1. 연구대상

1997년 1월부터 1998년 8월까지 원광대학교 치과대학 부속병원 보존과 및 구강외과에서 실시한 치근단 병소중 치근단 낭종 18례, 육아종 13례, 농양 12례와 정상 치배조직 9례를 포함하여 총 51례를 대상으로 하였다. 전체 환자의 평균연령은 41.6±21.5세 이며 여자가 59.8%를 차지하였다.

2. 연구방법

가. 조직학적 검색

치근단 병소로 생검된 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 알코올에 단계적으로 탈수한 후 파라핀 포매하여 4-5 μ m 두께로 연속 절편을 만들고 통상의 hematoxylin and eosin 염색을 하여 광학현미경으로 저배율 현미경 시야에서 섬유화 및 급, 만성 염증세포, 육아조직의 존재유무를 관찰하여 조직학적 재검경을 하였다. 치근단낭종에서 염증의 분류는 염증세포의 침윤에 따라 O, I, II, III, (negative, mild, moderate, severe)의 4등급(Table 1)으로 분류하였다.

나. 면역조직화학 염색

일차항체중 TGF- β (Santa Cruz, polyclonal, USA)와 MMP-1(Calbiochem, Monoclonal, USA)은 각각 1/50로 희석하여 사용하였고 면역조직화학검사를 위하여 LSAB (labelled streptavidine biotin, Dako Co, Denmark) kit를 이용하였다. 이차항체로는 anti-mouse IgG를 사용하였고, 발색을 위하여 AEC (Aminoethyl Carbazole, Zymed Co, USA)를 이용하였다. MMP-1은 면역염색 과정에서 Heat pressure방법 즉 일차항체 처리 전에 0.01M sodium citrate buffer(pH 6.0)을 넣고 6분간 끓인후 상온에서 식히고 이후에는 일반적인 면역염색 과정과 동일한

Table 1. Grading criteria of the inflammatory infiltration

Grade	Degree of inflammatory cell infiltration
O(negative)	Free of inflammatory cell infiltration
I(mild)	Focal small round cell infiltration
II(moderate)	Diffuse small round cell infiltration with a few neutrophils
III(severe)	Diffuse lymphoplasmic cell and neutrophil infiltration with inflammatory exudate

염증이 발견되는 다형핵백혈구에서 유리되는 단백분해효소는 농의 형성을 유도하며, 단백분해 과정에는 matrix metalloproteinase(MMP), serine계 단백분해효소, cathepsin등이 관여하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. MMP는 제 1형과 2형 교원질을 파괴시킬 수 있는 type IV collagenase (MMP-1, MMP-8), 제 4형 교원질과 변성된 간질 교원질을 파괴시키는 gelatinases (MMP-2, MMP-9), 그리고 proteoglycan, laminin, fibronectin, collagen 등의 비나선형 부위를 파괴하고 더욱 광범위한 기질특이성을 보이는 stromelysins (MMP-3, MMP-10)의 세가지 유형으로 분류된다⁵⁾.

치주질환과 관련하여 MMP에 대한 연구가⁶⁻¹²⁾ 많이 이루어졌는데 그 결과 MMP-2와 MMP-8은 치주질환에서 교원질의 파괴를 중재하고, 치은배양상청액^{9,10)}과 치은열구액에서도 존재하는 것으로 특히 치주질환과 관련이 있다고 보고되었다^{11,12)}. 그러나 치근단질환과 관련된 연구가 미흡하고, 치수 및 골에 분포하는 교원질이 제 1형과 제 3형임을 고려할 때 근관치료 영역에서 MMP-1에 대한 연구가 필요하다.

조직의 재생과 치유 과정의 기능적 개시자로 보이는 주된 조절 인자중 하나가 형질전환성장인자(Transforming Growth Factor, TGF)이다¹³⁻¹⁵⁾. TGF는 TGF- α 와 TGF- β 로 분류되고, TGF- α 는 약 5.6kDa의 분자량을 가진 50-amino-acid single-chain protein이며¹⁶⁾, EGF (Epithelial Growth Factor)와 42%의 동질성을 가지고 EGF 수용기에 경쟁적으로 작용하며 상피세포와 내피세포를 자극한다¹⁷⁾. TGF- β 는 25kDa의 분자량을 가지는 폴리펩티드로서 TGF- β 1, TGF- β 2 및 TGF- β 3의 3가지 형태로 구분되며 골과 혈소판에서 주로 기원하고, 상피세포의 증식을 억제하고 간엽세포의 증식을 자극하며, 섬유모세포의 화학주성 능력과 증식을 자극하며 세포외기질의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있고¹⁸⁻²²⁾ 또한 TGF- β 는 실험실상 metalloproteinase 합성 및 억제를 조절할 수 있어²³⁾ 상호연관이 있다고 하였다.

D' Souza 등²⁴⁾는 백서 대구치내에서 TGF- β 가 존재한다고 하였고, TGF- β 가 치수세포의 증식과 분화를 조절한다고 하여²⁵⁻²⁸⁾ 치수세포 손상이나 치근단 질환에 의해 TGF- β 가 유도될 수 있고 이에 중요한 요소로 작용할 수 있다고 여겨지나 치근단 질환과 관련되어 생체내 발현 또는 역할에 관한 연구는 미흡하여왔다.

본 연구에서는 치근단 병소에서 MMP-1의 분포 및 발현 정도를 관찰하고, MMP의 억제자인 TGF- β 발현과의 관련성을 파악하여 치근단 질환의 양태를 이해하는데 도움이 되고자 면역조직화학적 연구 및 Western blot analysis를 통해 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

단계로 처리하였다.

조직편을 박절하여 ProbeOn Plus 슬라이드(Fisher Scientific, USA)에 부착시킨 후 충분히 건조시켜 사용하였는데 염색은 ProbeOn Plus 슬라이드를 맞대어서 생기는 모세관 현상의 원리를 이용한 Microprobe System(Fisher Scientific, USA)으로 실시하였다. 파라핀 절편을 탈파라핀화 및 수화시킨 후 일차항체를 적정 비율로 희석해 30분간 방치하고 이차항체를 10분간 부란시켰다. 그리고 streptavidine alkaline phosphatase로 10분간 처리하고 발색시킨 후, Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하고 검경하였다.

다. 면역조직화학적 검색

먼저 면역조직화학적 발현부위를 치근단 병소의 세부조직 즉 모세혈관이나 섬유모세포등으로 나누어 이런 발현차이가 각 질환의 부위에 따라서 관련이 있는지를 평가하였다. 염색된 조직표본에서 각각의 항체에 대한 양성반응을 상대적인 발현정도에 따라 세포들의 60%이상, 30 - 60%, 5-30%, 그리고 5%미만이 양성으로 염색되었을때 각각 심도(+++), 중등도(++), 경도(+), 경미(±), 음성(-)으로 구분하였다. 양성판정 대상은 ×100시야에서 각 염색이 시행된 슬라이드중 염증세포가 가장 밀집되어 있고 병소의 가장 특징적인 부위 즉 낭종은 이장상피와 직하방 결체조직, 육아종은 육아조직, 농양은 농양 중심부위에서 각각의 일차항체에 대한 양성 염색 정도를 0 - 3까지 점수화하고 3회의 무작위 반복검경을 시행하여 최빈값을 택하였다. 통계처리에 사용된 프로그램은 SPSS 7.5이고 분석기법으로는 Kruskal-Wallis ANOVA와 Spearman's Correlation analysis를 시행하였다.

라. Western blotting analysis

각각의 실험군 및 대조군에서 TRI reagent (Montgomery, USA)로 단백질을 추출한 후 Lowey 방법으로 단백질을 정량분석한 후 이를 취하여 SDS-page와 Western blotting에 사용하였다.

Protein standard marker(Biorad, USA)와 단백질에 동량의 loading buffer를 첨가하고, 95℃에서 denaturation시켜서 8% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동한 후 Coomassie brilliant blue 염색을 시행하였다. 전기영동한 gel을 nitrocellulose membrane(Millipore, USA)에 transfer시켜서, 일차항체에 대한 비특이적 반응을 막기 위해 1시간 동안 blocking solution(Zymed, USA)처리하고 TGF-β(Santa Cruz, polyclonal, USA), MMP-1(Calbiochem, Monoclonal, USA)을 각각 1:200으로 희석한 후 90분간 반응시켰다. 그후 이차항체(Alkaline-phosphatase conjugated anti-rabbit Ig G, Sigma Co)

를 1시간 반응시켜 ECL (Amersham, USA) chemiluminescence detection kit를 이용하여 detection하였다. detection한 film은 Image Pro II program(Media Cybernetics, USA) 이용하여 optical density를 측정하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. 치근단 질환에서 MMP 및 TGF-β 발현부위

정상치배는 미분화간엽세포로 이루어진 성긴 점액섬유결체조직으로 구성되어 있었는데 TGF-β발현은 치성상피 잔사에서는 심도의 발현을 보였고 미분화 간엽세포와 모세혈관에서는 경도의 발현을 보였으며(Fig. 1A), MMP-1의 발현은 TGF-β발현부위와 일치하나 미분화간엽세포와 모세혈관에서 TGF-β보다 약간 많은 발현을 보였다(Fig. 1B).

치근단 농양의 농양강은 중성다형핵 백혈구가 관찰되며 혈관은 충혈되었는데, 괴사잔사(Necrotic debris)에서는 TGF-β가 거의 발현이 되지 않았으며 급성 염증세포 및 모세혈관에서는 중등도의 발현을 보였으나(Fig. 2A, 2C) MMP-1의 경우 TGF-β와는 달리 괴사잔사에서 심도의 발현증가를 보였고 염증세포나 모세혈관에서는 경미한 발현을 보여(Fig. 2B, 2D) 발현유형 차이가 관찰되었다.

치근단 육아종은 혈관조직이 섬유조직으로 대체되는 육아조직으로 증식되고 포말세포나 장방형의 콜레스테롤 열격(cleft) 및 주위에 다핵거대세포로 이루어져 있었는데 TGF-β발현의 경우 육아조직내 염증세포 및 모세혈관에서 중등도의 발현을 보여(Fig. 3A) 치근단 농양과는 큰 차이가 없었으며, 섬유결체조직벽내의 섬유모세포와 모세혈관에서 치근단 병소중 가장 많은 중등도 또는 심도의 발현을 나타내 섬유결체 조직형성 부위에 TGF-β발현이 많았고(Fig. 3C, 3E), 콜레스테롤 열격이나 다핵거대세포에서는 TGF-β가 경도의 발현을 보였다. MMP-1발현의 경우 육아조직내 염증세포 및 모세혈관에서는 중등도로써 TGF-β발현과 차이가 거의 없었으며 콜레스테롤 열격이나 다핵거대세포에서도 경미한 발현을 보여 큰 차이가 없었다(Fig. 3B). 섬유결체조직벽에서는 MMP-1이 거의 발현되지 않아 중등도 이상의 발현을 보인 TGF-β와 발현차이가 있었다(Fig. 3D).

치근단 낭종에서는 낭종벽이 상피로 이장되고 염증세포 및 내강, 섬유결체조직벽으로 이루어졌는데 TGF-β의 발현의 경우 피복 상피에서 중등도의 발현을 보여 치배내의 치성상피 잔사와 유사한 양상을 보였다(Fig. 4A, 4C). 상피층 중에서도 결체조직에 가까운 기저층과 표층 또는 각화층에서 발현이 주로 이루어지고 상기저층이나 유극층은 상대적으로 적었다. 염증세포 및 모세혈관에서 TGF-β의 발현은

Table 2. Expression pattern of TGF- β and MMP-1 in periapical lesions

Type of lesions	Structural components	TGF- β	MMP-1
Periapical cyst	lining epithelium	+ / + +	+ +
	inflammatory cells	+ +	+ +
	capillary	+ +	\pm
	fibrous wall	+ +	\pm
Periapical granuloma	inflammatory cells	+ +	+ +
	capillary	+ +	+
	fibrous wall	+ + +	\pm
	cholesterol cleft	\pm	+
	foreign body type giant cells	+	\pm
Periapical abscess	necrotic debris	\pm	+ +
	inflammatory cells	+	+ +
	capillary	\pm	+ +
Tooth follicle	epithelial rest	+ + / + + +	+ + +
	mesenchymal cells	+	+ / + +
	capillary	+	+ / + +

+ + + : severe, + + : moderate, + : mild, \pm : rare

Table 4. Correlation between MMP-1 and TGF- β expression in periapical lesion

TGF- β	MMP			
	Cyst	Granuloma	Abscess	Follicle
	0.407	0.605*	0.174	-0.326

*: statistically significant at $p < 0.05$

다른 치근단 병소와 큰 차이 없이 중등도의 발현을 보였으며 섬유결체조직 벽에서는 육아종보다는 감소된 양상을 보였다. MMP-1 발현의 경우 이장상피에서 TGF- β 발현보다 약간 많았고, 염증세포나 모세혈관에서도 TGF- β 와 유사하게 중등도로 나타났으며 섬유결체 조직벽에서는 TGF- β 보다 감소된 경미한 상태로 발현되었다(Fig. 4B, 4D).

2. 치근단 질환에서 TGF- β 과 MMP-1의 면역조직화학적 발현 차이

MMP의 발현 정도는 치근단 질환중 치근단 농양에서 가장 많은 발현을 보였으며 육아종이나 낭종은 유사한 정도를 보였는데 통계학적으로 유의하였다($p < 0.05$). TGF- β 에서는 치근단 질환중 육아종에서 가장 많은 발현 정도를 보였으며 통계학적으로 유의하였으며($p < 0.05$), 낭종이나 농양순으로 발현이 나타나 농양에서 가장 적은 발현 정도를 보였다.

Table 5. Correlation between inflammatory degree of periapical cyst and MMP-1 or TGF- β expression

	MMP-1	TGF- β
Inflammatory degree	0.206	0.106
p	0.412	0.674

3. 치근단 질환별 MMP-1와 TGF- β 의 상관관계

치근단 낭종 및 농양에서는 MMP와 TGF- β 의 발현 정도는 서로 상관관계가 없었으나 육아종에서는 MMP와 TGF- β 는 양의 상관관계를 가지고 있었으며 통계학적으로 유의하였다($p < 0.05$). 치배에서는 MMP와 TGF- β 가 음의 상관관계를 가지나 통계학적으로 유의하지 않았다.

4. 치근단 낭종의 염증정도에 따른 MMP와 TGF- β 와의 상관관계

치근단 낭종의 염증정도와 MMP와 TGF- β 발현 정도의 상관관계는 유의한 상관관계가 없었다. 따라서 치근단 낭종의 염증정도가 심할수록 MMP와 TGF- β 발현이 많이 나타나지 않았다.

5. Western blot analysis에 의한 치근단 조직에서 TGF- β 와 MMP-1 단백질발현(Fig. 5A, 5B)

치근단 질환에서 각각의 단백질 분리 후 Western blot에 따른 TGF- β 단백발현은 정상치배조직에서도 70 kDa의 band가 관찰되었고(Fig. 5), 치근단 육아종 및 농양에서는 이런 단백질발현 정도가 가장 많이 나타났으나 치근단 낭종에서는 이들 보다 적지만 치배조직보다는 많이 발현된 양태이었다. optical density를 측정 한 결과도 치배에서는 0.30 ± 0.01 , 농양에서는 0.63 ± 0.55 , 육아종에서는 0.68 ± 0.69 , 낭종에서는 0.39 ± 0.09 로 육아종에서 제일 많이 나타났다.

MMP-1단백의 경우는 TGF- β 에 비해 발현정도가 상당히 적었는데 적었고, 57 kDa의 band가 치근단 농양, 낭종, 육아종을 비롯하여 극히 소량으로 나타났으며 발현차이가 적었다. Optical density결과도 TGF- β 보다 10배 가량 발현정도가 적었는데 치배에서는 0.00 ± 0.00 , 농양에서는 0.03 ± 0.00 , 육아종에서는 0.02 ± 0.01 , 낭종에서도 0.03 ± 0.00 정도로 극히 미량으로 발현되었으며 치근단 질환간의 차이도 미약하였다

IV. 고찰

치수조직의 세균 감염은 치수괴사를 유발하며 근관계에 많은 염증산물이 축적되는데, 치수 자극 물질이 치근단 조직으로 침투하면 치근단 주위에 염증과 골흡수를 일으키고 염증과 골의 흡수에는 여러 가지 인자가 관여하는 것으로 알려져 왔다. 이중 MMP는 치주염과 같은 염증성 질환과 관련되어 조직파괴에 중요한 역할을 한다고 보고되어²⁹⁾ 지금까지 10개의 서로 다른 MMP군이 발견되었는데 기질 특이성에 따라서 간질교원분해효소(MMP-1, MMP-8), stromelysin(MMP-3, MMP-10), 제4형 교원분해효소(MMP-2, MMP-9)의 3 소그룹으로 분류된다. 지금까지의 연구에서 구강내에서 간질내 교원질 분해효소의 세포 기원과 역할이 주로 연구되어왔고^{23,30,31)} 변성된 간질교원질, laminin, elastin, fibronectin, 제 4형 및 7형 교원질과 관련된 기저막 부위를 파괴시킬 수 있는 제 4형 교원질분해효소³¹⁻³⁷⁾가 연구되어 왔다. MMP는 주로 파괴과정에 관련되어 대부분의 세포의 기질요소를 파괴시킬 수 있고 본 연구에서는 치수 및 골에 분포하는 교원질이 1형과 3형이기 때문에 MMP-1에 대한 연구를 단백질 수준에서 시행하였다.

정상 치배에서 치성상피잔사 또는 미분화간엽세포에서 MMP-1의 발현이 관찰되었는데, 이러한 소견은 Petersen 등³⁸⁾은 인간 피부각질 세포 배양에서도 procollagenase와 TIMP를 유리한다고 하였고, Lin 등³⁹⁾도 백서 구강점막 각질세포가 procollagenase를 생산한다고 보고하였으며, 교원분해효소는 화농성 육아종의 기저층 각질세포에서도 관

찰되었다⁴⁰⁾고 하여 정상상피에서도 발현할 수 있다고 한 점과 유사하며 게다가 정상치은에서 배양된 각질세포도 면역조직화학적으로 gelatinase A와 TIMP-1의 합성이 관찰되어⁴¹⁾ 본 연구의 염증이나 조직파괴가 거의 없는 치배조직의 치성상피 잔사에서 MMP-1의 발현이 관찰된 소견을 뒷받침한다고 사료된다.

또한 치배발생은 상피간엽세포의 상호작용에 의해서 이루어지는데 기저세포막요소 및 MMP 같은 파괴효소를 비롯한 세포외기질 분자도 이러한 상호작용에 관련한다고 보고되었다⁴²⁾. 또한 MMP와 다른 단백질분해효소가 법랑질형성 과정에도 관여한다고 하며 조상아세포 분비활성이 시작되면 법랑기와 치유두간의 기저막이 점차 없어지면서 조법랑아세포가 조상아세포로 직접 작용하게하기 때문에 인간 배태아 치아에서도 MMP가 발현되고⁴³⁾ 이런 MMP-2가 인간 치아형태 발생과정동안 기저막의 파괴 및 개조에 관련된다 고 하여 본연구결과에서 처럼 치배에서 발현이 된 점도 이와 동일하게 정상치배에서도 상피간엽세포의 상호작용으로 인해 MMP-1이 발현되었다고 생각한다.

본 연구에 이용된 MMP-1은 교원질, 라미닌, 프로테오글리칸 같은 세포외기질 요소를 파괴할 수 있는 효소군으로 제 1형, 2형, 3형, 7형, 8형, 10형 교원질과 젤라틴에 대해 기질 특이성이 있으며 류마치성 관절염, 골관절염, 치주염 같은 병태생리적 파괴에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 결합조직 내에서 세포유형을 알아보기 위해 Meikle⁴³⁾등은 MMP와 대식세포의 면역이중염색을 시행하였으나 paraformaldehyde와 acetone의 다른 고정액 때문에 염색이 어렵다고 하고, 조직학적이거나 형태학적으로 MMP가 섬유모세포와 대식세포에서 합성된다고 하였다. Hennj⁴⁴⁾는 치은조직내 낮은 수준의 MMP가 발현된다고 하였는데, 결합조직내에 섬유아세포나 대식세포에서 MMP-1이 발현된다고 한 반면, MMP2는 혈관과 모세혈관에 아주 밀접하게 관련되어 발현되었다고 하였다. 본 연구에서 치근단 육아종은 육아조직내 섬유모세포나 모세혈관을 중심으로 MMP-1 발현이 미약하게 나타나지만 섬유결체조직벽내의 섬유모세포와 모세혈관에서 경미한 발현을 보여 섬유결체조직 형성과 MMP-1 발현과는 큰 상관이 없고 MMP-1 발현이 최종적인 세포의 기질의 침착과 반응의 종료단계에서 주로 관계되기보다는 초기 단계 확산기에 주로 관련된다고 사료되었다.

Wooley와 Davis⁴⁵⁾는 면역조직화학 방법으로 인체 정상 및 염증성 치은에서 MMP의 발현을 조사했는데 MMP-1은 점합부에 근접한 부위나 치주상 상피에 있는 치은결합조직 세포와 연관되어 있으나 표면상피세포는 발현되어 있지 않으며 교원질 섬유소 및 염증세포 침윤과 관련이 있다고 보고하였다. 본 연구의 육아종이나 낭종의 섬유결체조직내 섬유모세포나 교원섬유에서도 발현이 나타났고 염증세포 침

윤이 많이 나타난 부위에 이런 MMP-1발현이 나타난 점은 Wooley의 결과와 유사하였지만, 이들의 연구와는 달리 본 연구의 치근단 낭종 상피에서는 발현이 어느 정도 나타났는데 이는 단백질분해가 활발히 일어나는 내강주변에 이상상피가 위치하기 때문에 발현되었다고 사료된다.

치근단 낭종에서 MMP-1발현의 경우 주로 이상상피 하방 염증세포 및 모세혈관을 중심으로 중등도로 나타났으며, 치근단 낭종의 염증 정도와 MMP-1 발현상관관계는 유의한 상관관계가 없었으나 MMP-1의 발현은 전반적으로 조직파괴 부위를 중심으로 나타났다. 치근단 낭종의 병인은 자극에 의하여 비후한 상피의 중심부에서 허혈성 괴사가 일어나 내강이 형성되면서 발생한다고 하는 것^{46,47)} 다른 병인은 일부의 치근단 육아종에서 염증세포들이 방출하는 단백질분해효소에 의한 조직의 괴사가 진행되어서 결체조직강(cavity)을 형성하면 이어서 강주변의 인접상피가 분열하여 결체조직강내로 이동하여 이장한다고 알려져 있다⁴⁶⁻⁴⁸⁾. 그러나 본 연구의 MMP결과에는 치근단 육아종과 낭종간에 발현차이가 크게 나지 않아 이런 낭종발생을 설명해줄 만큼의 뚜렷한 변화가 관찰되지는 않았으나 치배의 발현보다는 면역조직화학적으로나 Western blot 결과상 낭종에서의 발현이 많아 활성증가가 있었고 병인가능성을 암시한다고 사료된다.

질환간에도 발현 차이에서 치근단 농양의 경우 괴사상에서 심도의 발현증가를 보였고 염증세포나 모세혈관에서도 발현되어 MMP-1이 가장 많은 발현을 보였으며 통계적으로 유의하였는데($p<0.01$), 이는 치근단 농양에서 가장 많은 조직파괴를 보이기 때문으로 여겨지며 급성 염증이 일수록 MMP의 발현이 증가되는 것은 염증세포가 세포의 분열을 촉진시키는 신호를 보내고 이 신호로 성장인자의 생산이 증가되어 그 수용기와 결합하게 되고 성장인자와 수용기의 결합체가 세포내로 이입되고 최종적으로 용해소체에 의해 붕괴됨으로써 나타나는 상승 조절때문이라 생각된다.

본 연구에서는 치근단질환으로 인한 환자의 조직에서 MMP를 immunolocalization시킬 수 있었는데 MMP는 조직학적으로 결체조직 개조 또는 파괴를 보이는 부위에서 흔히 관찰되었다. 양성세포의 수와 분포는 상당히 다양했으며 본 연구의 결과는 치주질환에서 MMP가 조직재생에 관련된다고 보고한 Meikle의 보고⁴⁹⁾에서의 보고와 마찬가지로 치근단 질환에서도 조직개조에 MMP가 관계한다고 생각하며 치근단 낭종의 상피, 결체조직세포등에서 MMP의 합성과 분비를 통해 국소적 조직개조에 기여한다고 여겨졌다.

치근단 질환에서 Western blot에 따른 MMP-1단백의 경우는 TGF- β 에 비해 발현정도가 10배 정도 적었고, 치근단 질환간의 발현차이는 적었으나 농양에서 발현이 상대적으로 많아 면역조직화학 결과와 일치하였다. 따라서 감염된

조직에서는 염증세포에 의해 MMP산물이 유도될 수 있다고 생각되며, 각 치근단 질환간에 큰 차이가 없는 점은 치근단 질환이 계속적인 과정으로서 개조가 일어나고 있다는 것을 시사한다고 사료된다.

조직 개조의 국소적 조절물질은 대부분 성장인자(growth factor)이며, 조직의 재생과 치유 과정의 기능적 개시자로 보이는 주된 조절 인자중 하나는 TGF- β 이다^{49,50)}. TGF- β 는 분자량이 25,000이며, 가장 흔한 기원은 골과 혈소판으로서, 작용은 섬유모세포에서 세포외 기질 단백질인 교원질(제 I, III 및 IV형)와 fibronectin의 합성을 촉진시키며, 기질 단백질을 분해시키는 단백질분해효소의 합성을 감소시키며⁵¹⁾, 단백질분해효소의 억제효소를 생산하여 세포외 기질의 축적을 돕는다고 보고하였다⁵²⁾.

본 연구에서는 TGF- β 가 치근단 질환중 육아종에서 가장 많은 발현을 보였는데 통계학적으로 유의하였으며($p<0.05$), 낭종이나 농양순으로 발현이 나타나 농양에서 가장 적은 발현 정도를 보였다. 육아종이나 낭종에서도 섬유결체 조직벽내의 섬유모세포와 모세혈관에서 중등도 또는 심도의 발현을 보여 섬유결체조직 형성부위에 TGF- β 발현이 많음을 알 수 있어 TGF- β 가 창상 치유를 향상시키며, 과도한 섬유성 결합조직과 육아조직의 형성을 촉진할 수 있다는^{49,53)} 보고와 일치한다고 사료된다.

치근단 농양의 급성 염증세포 및 모세혈관에서는 중등도의 발현을 보였으며 치근단 육아종이나 낭종에서의 염증세포 및 치근단 농양과는 TGF- β 발현에는 큰 차이가 없어 cytokine중에서 TGF- β 는 연조직과 경조직의 결합조직 치유에 다양한 기능을 하는 중요한 조절자로 제시되며, 또한 결합조직 세포에서 분비⁴⁹⁾될 뿐만 아니라 활성화된 대식세포, 탈과립화된 혈소판에 의해서 유리되기 때문에 염증세포에서는 발현차이가 없는 것으로 여겨졌다.

Summers⁴⁹⁾의 연구에 의하면 치근단 육아종의 결체조직 부위에서 단백질분해효소의 활성이 관찰되는데 이는 결체조직의 분해를 초래하여 결체조직내 빈강을 형성하고 이어서 상피잔사가 분열하여 치근단낭을 형성한다고 하였다. 본 연구에서도 TGF- β 발현의 경우 근단낭종의 피복 상피에서 중등도의 발현을 보여 치배내의 치성상피잔사와 유사한 발현을 보이며 상피층 중에서도 결체조직에 가까운 기저층과 중앙부에 액화성 괴사가 있는 경우 표층 또는 비각화층에서 발현이 주로 이루어져 있다는 점이 강주변의 인접상피가 분열해서 나타나는 치근단 낭종의 병인설을 지지해주는 소견이라고 여겨진다.

이런 섬유형성조직 증가는 TGF- β 의 여러 작용에 영향을 미치는데 섬유아세포 증식증가⁵⁴⁾, ii) fibronectin, type I collagen, integrin, laminin, glycosaminoglycan 등의 세포외기질 구성요소의 합성 증가⁵⁵⁾, iii) 직접적인 단백질분해효소(protease) 활성의 억제와 단백질분해효소 억제인자의 합

성을 자극해 세포외기질의 퇴화를 감소시킨다^{56,57)}고 알려져 있어 치근단 질환의 팽창성 성장을 하는 치성낭의 이상상피 및 결합조직벽에서도 발현되었다고 할 수 있다.

또한 본 연구대상이 치근단 병소의 발생과정 전기간 동안의 지속적인 변화에 관한 것은 아니라, 주로 발생과정 중의 한 순간 또는 발생 후의 상태에 관한 것이기 때문에 치근단 병소의 발생중의 전반적인 변화에 관한 연구들이 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 연구대상을 조직학적재검정을 통한 낭종, 육아종, 농양으로 분류하였지만, 이들 치근단 질환의 분류 및 진단이 임상적, 방사선 및 병리학적으로 어렵고 질환 진행중의 하나로도 보기 때문에 보다 합리적인 임상에 도움이 될 수 있는 지표와 연관시켜 향후 연구되어야 한다.

본 연구에서는 치근단질환으로 인해 치근단조직에서 TGF- β 가 translational level에서 발현이 되기 때문에 치유과정의 개시자로서 TGF의 활성은 이 peptide가 autocrine & paracrine 신호 분자로서 조직내에서 섬유아세포의 반응을 유지, 증식 및 동시에 일어나게 해주기 위해 기능하고 있음을 알려주었다. MMP-1도 본 연구의 치근단 질환의 파괴 및 개조에 관련이 되어있었고 metalloproteinase의 조직 억제제는 또한 많은 세포에 대한 성장 촉진 활성⁵⁸⁾을 보이지만 어떻게 이런 활성이 존재하고 metalloproteinase의 억제 활성에 관련되어 있는지는 정확히 알려지지 않아 실험실내 또는 생체에서 이에 대한 연구가 이루어져야 한다.

V. 결 론

치근단 질환에서 TGF- β 및 MMP-1 발현부위와 정도를 알아보고 치근단 질환과의 상관성을 밝히며, 염증세포 침윤 정도와의 관련성 유무를 보기 위해 면역조직화학염색과 Western blot analysis를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치근단 질환중 MMP의 발현은 치근단 농양에서 가장 많은 발현을 보였으며, TGF- β 에서는 육아종에서 가장 많은 발현을 보였으며 병소별 차이는 통계학적으로 유의하였다.
2. 치근단 낭종 및 농양에서는 MMP와 TGF- β 의 발현정도 간에 서로 상관관계가 없었으나 육아종에서는 MMP와 TGF- β 는 양의 상관관계를 가지고 있었으며 통계학적으로 유의하였다.
3. 치근단 낭종의 염증정도와 MMP 및 TGF- β 발현정도 간에는 유의한 상관관계가 없었다.
4. 치근단 질환에서 Western blot에 따른 TGF- β 단백은 70kDa의 band로 치근단 육아종 및 농양에서 가장 많이 나타났으며, MMP-1단백의 경우 57kDa의 band가

TGF- β 에 비해 발현 정도가 약 10배 적었고, 치근단 질환간의 발현은 큰 차이가 없었다.

이상과 같은 결과로 MMP-1은 치근단 질환중 조직파괴 부위를 중심으로 나타났으며 TGF- β 는 결합조직형성 부위에 주로 발현되어 이들의 상호발현이 치근단 질환의 진행 및 국소적 조직개조에 관여하리라고 사료된다.

참고 문헌

1. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endodon* 13: 535-540, 1987.
2. Bergenholtz G. Pathogenic mechanism in pulpal disease. *J Endod* 16(2): 98-101, 1990.
3. Lim GC, Torabinejad MT, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. Interleukin-1 β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endodon* 20: 225-227, 1994.
4. Salo T, Makela M, Kylm niemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9(72kDa and 92 kDa type IV collagenases) during early human wound healing. *Lab Invest* 70: 176-182, 1994.
5. Murphy G, Docherty AJP. The matrix metalloproteinases and their inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 120-125, 1992.
6. Heath JK, Atkinson SJ, Hembry RM, Reynolds JJ, Meikle MC. Bacterial antigens induce collagenase and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts through a primary effect on circulation mononuclear cells. *Infect Immun* 55: 2148-54, 1987.
7. Meikle MC, Heath JK, Reynolds JJ. Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. *J Oral Pathol* 15: 239-250, 1986.
8. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy G, Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and Interleukin 1: Evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodont Res* 24: 207-213, 1989.
9. Woolley DE, Akroyd CA, Evanson JM, Soames JV, Davies RM. Characterization and serum inhibition of neutral collagenase from cultured dog gingival tissue. *Biochim Biophys Acta* 497: 144-50, 1978.
10. Heath JK, gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Human gingival tissues in culture synthesize three metalloproteinases and a metalloproteinase inhibitor. *J Periodont Res* 17: 183-90, 1982.
11. Kryshalskyj E, Sodek J, Ferrier JM. Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitor in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic changes in experimental periodontitis in the beagle dog. *Archs Oral Biol* 31: 21-31, 1986.
12. Villela B, Cogen RB, Bartolucci AA, Birkedal-Hansen H. Collagenolytic activity in crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis, and from healthy control subjects. *J Periodont Res* 22: 381-9, 1987.
13. Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: A cause and a cure. *J Clin Immunol* 12: 61-74, 1992.
14. Igotz RA, Massage J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their

- incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337-45, 1986.
15. Whitby DJ, Ferguson MWJ. The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development* 112, 651-68, 1991.
 16. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Goeddel DV. The murine transforming growth factor- β precursor. *J Biol Chem* 261:4377-4379, 1986.
 17. Penttinen RP, S Kobayashi and P Bornstein : Transforming growth factor β increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1105-1108, 1988.
 18. Wergedal JE, S Mohan, M Lundy and DJ Baylink : Skeletal growth factor and other growth factors and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells. *J Bone Min Res* 5: 179-186, 1990.
 19. Hock JM, E Canalis and M Centrella : Transforming growth factor- β stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology* 126: 421-426, 1990.
 20. Antosz ME, CG Bellows and JE Aubin : Effects of transforming growth factor β and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 140: 386-395, 1989.
 21. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, and Wang EA : The Healing of Segmental Bone Defects, Induced by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein (rhBMP-2). *J Bone and Joint Surg* 74A : 659-670, 1992.
 22. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, and Goeddel DV : Human Transforming Growth Factor β complementary DNA sequence and Expression in Normal and Transformed Cells. *Nature* 316-22 : 701-705, 1985.
 23. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 264: 1860-1869, 1989.
 24. D' Souza RN, Happonen R-P, Flanders KC, Butler WT. Histochemical localization of transforming growth factor beta 1 in developing rat molars using antibodies to different epitopes. *J Biol Buccale* 18: 299-306, 1990.
 25. Liang R-F, Nishimura S, Maruyama S, Hanazawa S, Kitano S, Sato. Effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on clonal rat pulp cells. *Arch Oral Biol* 35: 7-11, 1990.
 26. Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 37: 231-236, 1992.
 27. Vahtokari A, Vainio S, Thesleff I. Associations between transforming growth factor beta 1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development* 113: 985-994, 1991.
 28. Jepsen S, Schiltz P, Strong DD, Scharla SH, Snead ML, Finkelman RD. Transforming growth factor-beta mRNA in neonatal bovine molars visualized by in situ hybridization: Potential role for the stratum intermedium. *Arch Oral Biol* 37: 645-653, 1992.
 29. Werb Z. Proteinases and matrix degradation. In: *Textbook of rheumatology*. 3rd ed. Kelly WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Sledgy CB, editors. Philadelphia: Saunders, pp 300-321, 1989.
 30. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodont Res* 23: 386-393, 1988.
 31. Uitto VJ, Suomalainen K, Sorsa T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J Periodont Res* 25: 135-142, 1990.
 32. Seltzer JL, Adams SA, Grant GA, Eisen AZ. Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Biol Chem* 256: 4662-4668, 1981.
 33. Seltzer JL, Akers KT, Weingarten H, Grant GA, McCourt DW, Eisen AZ. Cleavage specificity of type IV collagenase (gelatinase). *J Biol Chem* 265 : 20409-20413, 1990.
 34. Okada Y, Mordomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymatic properties. *Eur J Biochem* 194: 721-730, 1990.
 35. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Human 92-and 72-kilodalton type IV collagenases and elastases. *J Biol Chem* 266: 7870-7870, 1991.
 36. Fessler LI, Duncan KG, Fessler J, Salo T, Tryggvason K. Characterization of procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J Biol Chem* 259: 9783-9789, 1984.
 37. Seltzer JL, Eisen AZ, Bauer EA, Morris NP, Glanville RW, Burgeson RE. Cleavage of type VII collagen by interstitial collagenase and type IV collagenase (gelatinase) derived from human skin. *J Biol Chem* 264: 3822-3826, 1989.
 38. Petersen MJ, Woodley DT, Stricklin Gp, O'Keefe EJ. Constitutive production of procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 92: 156-159, 1992.
 39. Lin HY, Wells BR, Taylor RE, Birkedal-Hansen H. Degradation of type I collagen by rat mucosal keratinocytes. Evidence for secretion of a specific epithelial collagenase. *J Biol Chem* 262: 6823-6831, 1987.
 40. Saarialho-Kere UK, Chang ES, Welgus HG, Parks WC. Distinct localization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in wound healing associated with ulcerative pyrogenic granuloma. *J Clin Invest* 90: 1952-1957, 1992.
 41. Bampton JLM. Human gingival keratinocytes: their characterization and contribution to basement membrane integrity and inflammation. PhD Thesis. University of London, 1991.
 42. Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res* 74:1226-1234, 1995
 43. Meikle MC, Hembry Rm, Holley J, Horton C, McFarlane CG, Reynold JJ. Immunolocalization of matrix metalloproteinase and TIMP in human gingival tissues form periodontitis patients. *J Periodont Res* 29:118-126, 1994.
 44. Henning BH. Role of matrix metalloproteinase in human periodontal disease. *J Perio Res* 64:474-484, 1997.
 45. Woolley DE, Davies RM. Immunolocalization of collagenase in periodontal tissues. *J Periodont Res* 16: 292-297, 1981
 46. Shear M. The histogenesis of the dental cyst. *Dent Prac* 13. 238-243, 1963.
 47. Ten Cate AR. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cysts. *Oral Surg* 34: 956-964, 1972

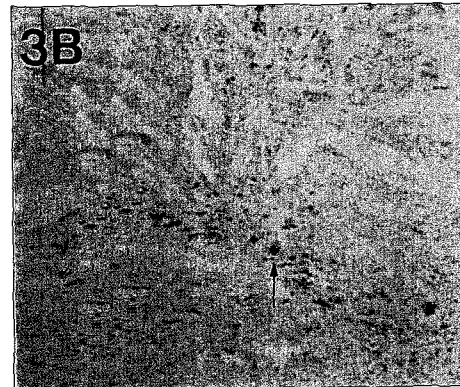
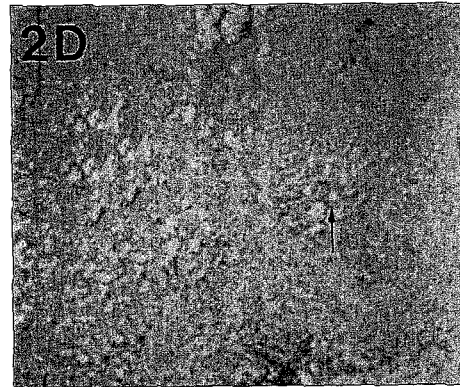
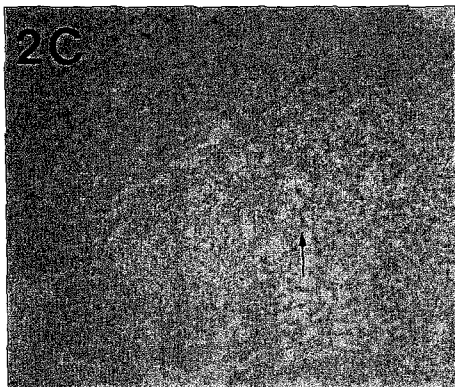
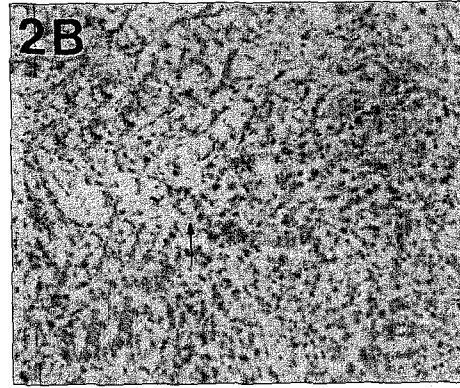
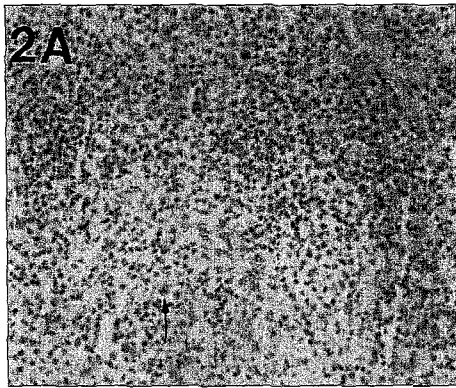
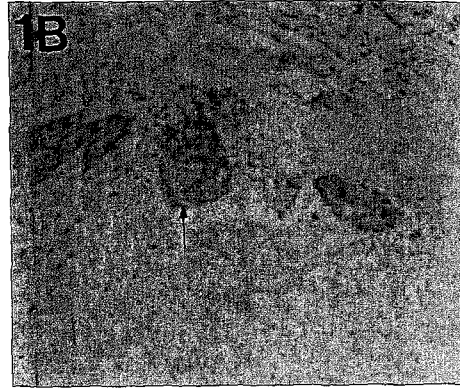
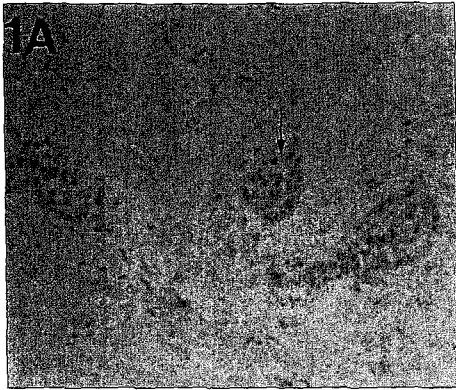
48. Summers L. The incidence of epithelium in periapical granulomas and the mechanism of caritation in apical dental cysts in man. *Archs Oral Biol* 19: 1177-1180, 1974.
49. Thomas FD, Kawahara RS. Growth factors and wound healing. Platelet-derived growth factor as a model cytokine. *Annu Rev Med* 42: 567-84, 1991.
50. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani G. Transforming growth factor- β induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122: 103-11, 1993.
51. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. TGF- β causes a persistent increase in steady state amounts of type and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247: 597-604, 1987.
52. DeLarco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4001-4005, 1978.
53. Whibty DJ, Ferguson MWJ. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* 147: 207-15, 1991
54. Ishikawa O, LeRoy EC, Trojanowaka M. Mitogenic effect of transforming growth factor beta-1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-derived growth factor alpha-receptors. *J Cell Physiol* 145: 181-186, 1990.
55. Igotz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337-4345, 1986.
56. Laiho M, Saksela O, Andreasen PA, Keski-Oka J. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor β . *J Cell Biol* 103: 2403-2410, 1986.
57. Lund LR, Riccio A, Andreasen PA, Nielsen LS, Kristensen P, Laiho M, Saksela O, Blasi F, Dano K. Transforming growth factor- β is a strong and fast acting positive regulator of the level of type-1 plasminogen activator-inhibitor mRNA in WI-38 human lung fibroblasts. *EMBO J* 6: 1281-1286, 1987.
58. Kapila YL, Kapila S, Johnson PW. Fibronectin and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinase inhibitors in human periodontal ligament cells. *Matrix Biol* 15: 251-261, 1996.

사진부도 설명

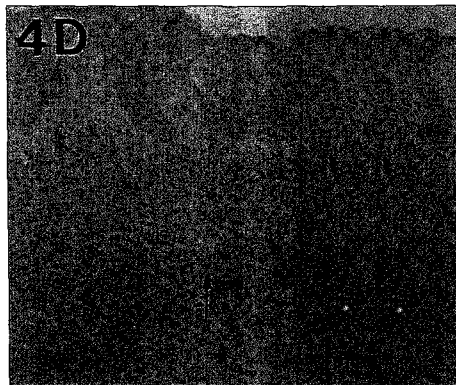
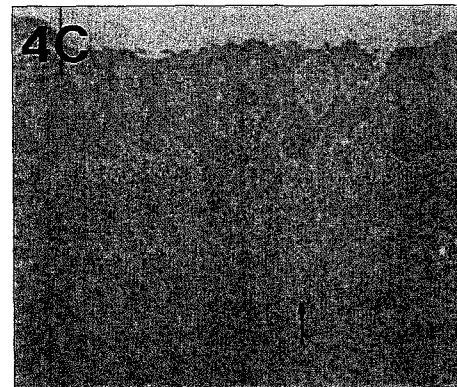
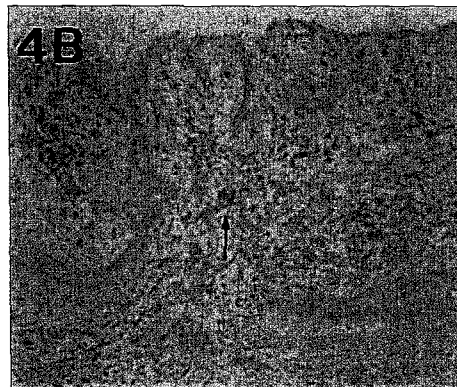
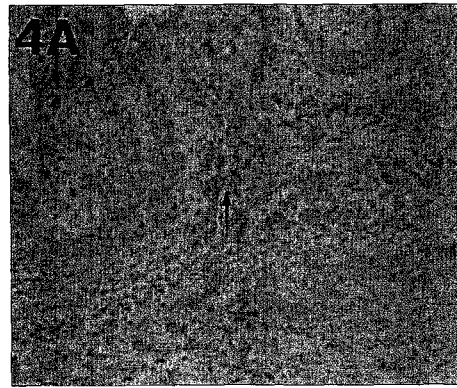
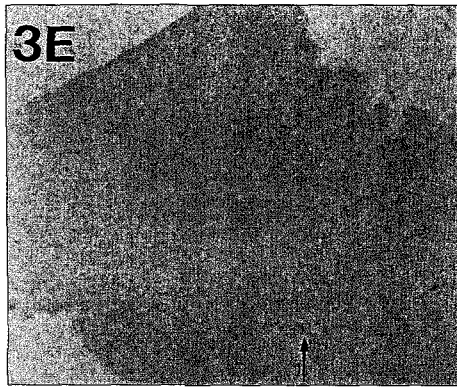
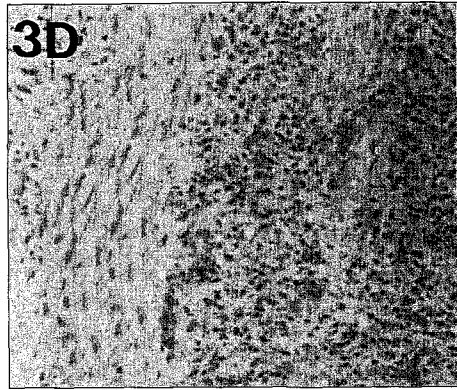
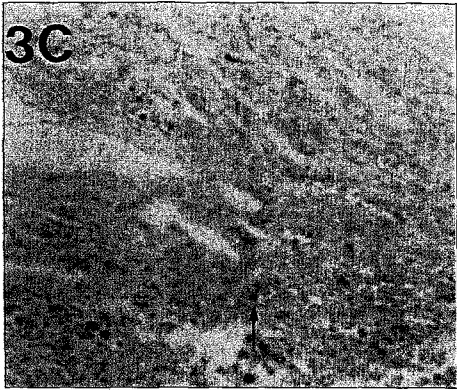
- Fig. 1 Immunohistochemical staining of TGF- β (1A, $\times 200$) and MMP-1(1B, $\times 200$) of tooth follicle. TGF- β & MMP-1 positive cells (arrow) is seen in the odontogenic epithelial rests and undifferentiated mesenchymal cells.
- Fig. 2. Immunohistochemical staining of TGF- β (2A, 2C $\times 100$) and MMP-1(2B, 2D $\times 200$) of periapical abscess. TGF- β expression was rare in abscess cavity and necrotic debris, but MMP-1 was more expressed than TGF- β .
- Fig. 3. Immunohistochemical staining of TGF- β (3A, 3C, 3E, $\times 100$) and MMP-1 (3B, 3D $\times 100$) of periapical granuloma. TGF- β expression in cholesterol cleft, foreign body type giant cells and granulation tissue were similar to that of MMP-1. But TGF- β expression in fibroblasts were prominent (E).
- Fig. 4. Immunohistochemical staining of TGF- β (4A, 4C $\times 100$) and MMP-1(4B, 4D $\times 100$) of periapical cyst. TGF- β expression is similar to MMP-1 in mild inflammation (A, B) severe inflammation (C, D).
- Fig. 5. Western blot analysis for the TGF- β (5A) and MMP-1(5B) protein level in periapical lesions. Lane 1: marker, 2: tooth follicle, 3: periapical abscess, 4: periapical granuloma (mature type), 5: periapical cyst (moderate inflammation)

Cell extract equivalent to 50 μ g of total cellular protein of tissue was electrophoresed by 8% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The protein level of TGF- β and MMP-1 in periapical tissue was probed with antibody diluted by 1:1000, 1:200, respectively. This data shown are from one experiment and representative; however, the similar results were obtained in duplicate experiment.

사진부도 ①



사진부도 ②



사진부도 ③

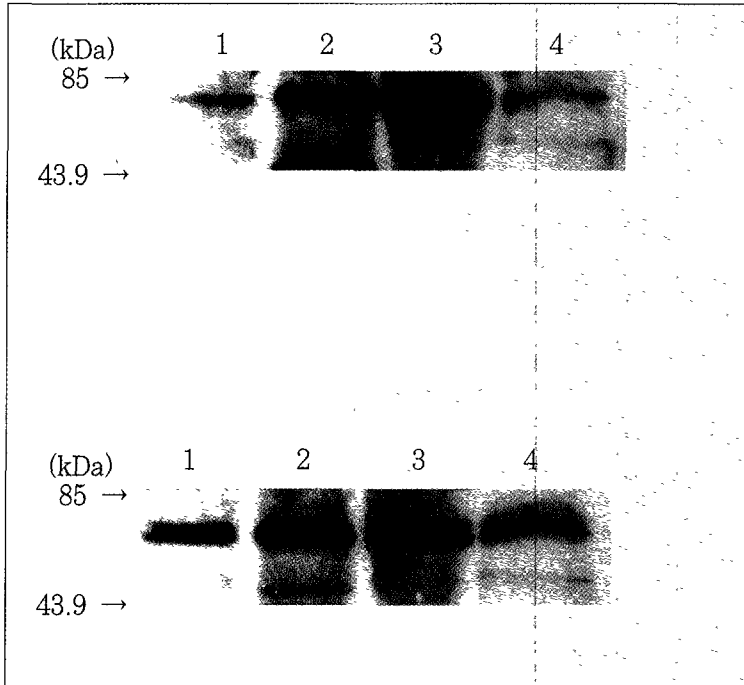


Fig. 5