

하치조신경 절단 후 흰쥐 삼차신경절에서 VIP-IR의 변화

김흥중 · 박주철 · 김현섭 · 문주훈

조선대학교 구강생물학연구소

ABSTRACT

VIP IMMUNOREACTIVITY IN THE RAT TRIGEMINAL GANGLION AFTER INFERIOR ALVEOLAR NERVE AXOTOMY

Heung-Joong Kim, Joo-Cheol Park, Hyun-Sub Kim, Joo-Hoon Moon

Oral Biology Research Institute, Chosun University

The purpose of this study was to investigate the distribution and fluorescence intensity of vasoactive intestinal polypeptide(VIP) immunoreactive cells in rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve axotomy. The animals were divided into normal and two experimental groups. The experimental animals were sacrificed at 14th and 28th day after inferior alveolar nerve axotomy. The trigeminal ganglion was removed and immersed in the 4% paraformaldehyde-0.2% picric acid in 0.1M phosphate buffer. Serial frozen sections about 16 μ m in thickness were cut with a cryostat. The immunofluorescence staining was performed. The rabbit anti-VIP(1 : 8,000) was used as primary antibody and fluoresceine isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-rabbit IgG(1 : 80) as secondary antibody.

The slides were observed under confocal laser scanning microscope. Three-dimensional images were constructed from 9 serial images(each 1 μ m in thickness) made by automatic optical sectioning. Unprocessed optical sections were obtained and stored on a optical disk. Color picture were printed by a video copy processor.

The results were as follows:

1. The appearance of VIP immunoreactive cells in the mandibular part of trigeminal ganglion was $8.79 \pm 1.99\%$ in normal group and $39.16 \pm 5.62\%$ in 14 days, $16.25 \pm 2.39\%$ in 28 days after inferior alveolar nerve axotomy groups.
2. The relative fluorescence intensity of VIP immunoreactive cell bodies in the mandibular part of trigeminal ganglion was 134.40 ± 10.39 in normal group and 192.88 ± 14.06 in 14 days, 143.10 ± 5.02 in 28 days after nerve axotomy groups. Therefore, the relative fluorescence intensity of 14 days after nerve axotomy group was 43.3% higher than intensity of normal group.
3. In optical single section analysis of VIP immunoreactive cell bodies, white cell bodies(moderate fluorescence intensity) were the most abundant in normal and 28 days after nerve axotomy groups. Whereas, in 14 days after nerve axotomy group, red cell bodies(high fluorescence intensity) were the most abundant.
4. In optical serial section analysis of VIP immunoreactive cell bodies, red cell bodies(high fluorescence intensity) were observed in a part of the 9 sections of normal and 24 days after nerve axotomy groups. Whereas, red cell bodies were observed in all of the 9 sections of 14 days after nerve axotomy group.
5. The results indicates that number and fluorescence intensity of VIP immunoreactive cells were increased in the mandibular part of trigeminal ganglion following inferior alveolar nerve axotomy.

Key Words : Inferior alveolar nerve axotomy, Trigeminal ganglion, Vasoactive intestinal polypeptide(VIP), Confocal laser scanning microscope, Fluorescence intensity

* 이 논문은 1998년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

I. 서 론

Vasoactive intestinal polypeptide(VIP)는 28개의 아미노산으로 구성되어 있으며, Said와 Mutt¹⁾에 의해 돼지 십이지장의 내분비세포에서 처음으로 확인된 이후 여러 동물의 위장관, 내분비샘, 뇌 및 척수 등에 광범위하게 분포되어 있으며, 당분해, 혈관확장, 분비조절, 수면유도 및 통증조절 등 매우 다양한 신경생물학적인 기능을 갖고 있음이 여러 연구자들에 의해 밝혀졌다²⁻⁵⁾. 또한 VIP는 신경성장인자(nerve growth factor)를 제거한 실험에서 신경세포의 죽음을 방지하며⁶⁾, 축삭의 확장을 증진^{7,8)} 시킨다는 보고로 미루어 볼 때 신경재생에 있어 중요한 기능을 하리라 사료된다.

신경절단 등 말초신경 손상에 의한 VIP의 연구는 각종 실험동물의 척수 및 등뿌리신경절에서의 연구는 많다⁹⁻¹⁴⁾. 치의학영역에서의 연구를 살펴보면, 삼차신경절^{15,16)}, 삼차신경척수감각핵¹⁷⁾, 삼차신경중뇌핵¹⁸⁾, 접구개신경절¹⁹⁾, 척수²⁰⁻²²⁾ 등에서의 연구가 있다. 그러나 이들 연구의 대부분이 정상 조직에서 VIP의 분포에 관한 것이며, 신경손상 후 악안면영역의 감각과 밀접한 관련이 있는 삼차신경절에서의 연구는 Zhang 등¹⁵⁾과 Fristad 등¹⁶⁾의 보고와 같이 최근의 연구인데 더욱 자세한 분포변화 및 형광강도 분석 등이 필요하여 본 연구를 시행할 필요가 있다.

삼차신경절(trigeminal ganglion)은 악안면영역으로부터 전달되는 감각섬유의 일차감각신경원이 위치하는 신경절로 신경절세포의 말초가지는 눈신경, 상악신경, 하악신경으로 구성된다. 또한 이들 감각신경의 세포체는 신경절 내에서 해부학적으로 분리되어 위치하고 있다. 최근에 치의학영역에서 삼차신경의 말초가지들을 절단시 삼차신경절에서 calcitonin gene-related peptide(CGRP), substance P, neuropeptide Y(NPY), VIP 등 신경전달물질들의 변화에 대한 연구가 면역조직화학적 방법을 이용하여 진행되어 왔다.^{17,23-29)}

면역조직화학연구에서는 그 동안 특정한 항원의 위치를 알기 위해 일반적으로 과산화효소, 형광염료 등 여러 표지물질을 이용하여 광학현미경, 전자현미경 및 형광현미경으로 관찰하였다. 최근에는 공초점레이저주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)이 개발되어 면역조직화학연구에서 면역반응세포의 3차원 영상 및 염색에 대한 형광강도 분석에 이용되고 있다.

공초점레이저주사현미경은 시료 중에서 원하는 지점에 광원인 레이저와 검출기의 초점을 동시에 일치시켜 초점에서 벗어난 상에 의한 간섭현상을 최소화함으로써 상의 선명도를 극대화시킨 현미경이다. 즉, 시료, 광원 및 검출기의 초점을 동시에 일치(confocal)시킴으로써 기존의 현미경을 통해 얻을 수 없었던 다양한 종류의 정보를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 광원인 레이저선이 주사하는 표본의 절단

면은 기계적인 절편이 아닌 광학적 절편(optical sectioning)이므로 표본을 얇게 제작하지 않아도 선명한 상을 얻을 수 있고 표본의 두께를 여러 절단면으로 주사하여 컴퓨터 프로그램으로 재구성하면 입체적인 구조를 볼 수 있다. 주사 속도가 빨라 살아 있는 세포에서 급속히 이동하는 세포내 칼슘이온농도, pH 등의 변화를 상으로 구성할 수 있다. 또한 형광장치가 있어 조직 또는 세포 속의 형광물질이나 인위적으로 표지한 여러 종류의 형광을 서로 다른 색으로 동시에 추적할 수 있고 세포질내 항원의 형광강도를 색으로 구분하여 나타낼 수 있다³⁰⁻³²⁾. 생물학 분야에서는 fluorescein isothiocyanate(FITC), rhodamine, Fluo-3와 같은 다양한 형광물질을 이용하여 세포내 신경전달물질을 여러 가지 색으로 추적할 수 있다. 또한 형광염색을 이용한 생체 세포내 구조물의 형태적 변화, 염색체 분석, 막성분의 이동현상, 소포체나 사립체 등의 세포내소기관, 세포간의 신호전달의 확인 등이 가능하다^{30,33)}.

Watson³⁴⁾이 1991년 치의학영역에서 공초점레이저주사현미경의 응용에 대해 보고한 이후 Ito 등³⁵⁾이 사람 치은상피에서 Langerhans세포의 삼차원적 상을 관찰하여 보고하였고, Chantawiboonchai 등³⁶⁾은 생쥐의 치주인대에서 oxytalan fibers의 삼차원적 분포를 조사하였다. 말초신경을 절단 후 삼차신경에서의 신경펩타이드를 관찰한 연구로는 Fristad 등¹⁶⁾이 흰쥐의 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서 VIP와 substance P의 공존을 연구하여 보고하였고, 국내에서는 오 등³⁷⁾이 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서의 substance P 면역반응세포의 분포와 형광강도에 대해 보고하였으며, 김과 Wäsle³⁸⁾는 노화된 흰쥐 삼차신경절 및 삼차신경척수핵에서 neuropeptide Y 면역반응세포의 염색에 대한 형광강도를 연구하여 보고하였다.

하치조신경손상에 의해 VIP가 삼차신경절에서 어떻게 변화하는지를 규명한다면, 다른 신경전달물질의 변화와 함께 삼차신경통의 기전을 이해하고, 더 나아가서는 악안면영역의 동통조절에 도움을 줄 수 있을 것이라고 생각된다. 따라서 본 연구는 흰쥐의 하치조신경을 절단했을 때 일차구심성 신경원이 위치하는 삼차신경절에서 통각 전달에 있어 중요한 신경전달물질인 VIP의 분포 및 형광강도를 공초점레이저주사현미경을 이용하여 연구하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

체중 150~200g 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 암, 수 구분 없이 사용하였으며, 정상군 및 하치조신경 절단 후 14일, 28일 경과군에 각 8마리씩 총 24마리를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 하치조신경절단(inferior alveolar nerve axotomy)

Ether로 흡입마취 후 ketamine HCl(150mg/kg, 유한양행)로 복강내 주사하여 전신마취시켰다. 좌측 하악지 부위의 털을 제거한 다음, 교근 부위를 절개하여 하악지를 노출시켜 용선을 확인하였다. 용선 전방 부위를 고속핸드피스(high speed handpiece)를 이용하여 제거하여 하치조신경을 노출시킨 다음 탐식자를 이용하여 격리시킨 후, 가위로 탐식자의 양쪽을 절단하였다. 시술 후 교근과 피부를 봉합한 다음 소독하고 항생제를 근육내에 주사한 후, 희생시킬 시기까지 사육하였다.

2) 조직처리

하치조신경절단 후 14일, 28일 경과 후에 각각 희생시켰다. 조직처리 과정은 다음과 같다. Ether로 흡입마취 후 ketamine HCl(150mg/kg, 유한양행)을 복강내로 마취한 다음, 흉강을 열고 좌심실에 삼판을 삽입하여 0.3% heparin이 함유된 식염수로 관류하고 4% paraformaldehyde-0.2% picric acid in 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 300ml 정도 사용하여 관류고정을 하였다. 좌측 삼차신경절을 적출한 후 4°C의 동일 고정액에서 24시간 동안 고정하였다. 냉동절편을 얻기 위하여 4°C의 30% sucrose에 12시간 처리한 후 O.C.T compound에 포매하여 -200°C의 Cryostat에서 16 μ m의 두께로 박절하였다. 박절한 절편을 gelatin coated slide에 부착하여 cold dryer로 2시간 건조 후 염색시까지 냉동고에 보관하였다.

3) 면역형광염색

조직절편을 0.1M phosphate buffered saline(PBS)으로 수회 세척 후, 항원의 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal goat serum-0.5% bovine serum albumin in 0.1M PBS로 처리하였다. 일차항체인 rabbit anti-VIP(1:8,000, Sigma, USA)에 4°C에서 24~48시간 동안 반응시켰다. 일차항체를 함유한 용액은 0.2% triton X-100를 넣어 조직 내에 항체 투과율을 높였다. 조직절편을 PBS로 세척 후 이차항체인 fluorescence isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-rabbit IgG(1:80, Sigma, U.S.A.)를 사용하여 실온에서 60~90분 동안 반응시켰다. 각 군간의 서로 다른 절편에서의 형광강도를 표준화하기 위해서 각 형광염색시 각 군의 절편을 동시에 처리하였다. 반응이 끝난 절편은 PBS로 세척 후 형광물질을 보존하기 위해 수용성 봉입제인 Gel/Mount*(Biomedica)로 봉입하였다.

4) 공초점레이저주사현미경

면역형광염색을 시행한 시료는 기초과학연구원(대덕연구단지)의 공초점레이저주사현미경(Zeiss, Germany)를

사용하여 관찰하였다. 광원으로 488nm를 방출하는 아르곤 레이저(Ar Laser)를 이용하였고, 화상(image)은 515nm long pass 방출필터(emission filter)를 통해 여과되었으며, 해상도는 1024 \times 1024였다. 3차원적 화상은 먼저 자동화된 광절편 프로그램에 의해 1 μ m 두께로 광연속절단(optical serial sectioning)을 하여 9개의 연속상을 얻었다. 또한 3차원 구성(3D-projection) 및 층별강도(depth coding) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 모든 화상은 광디스크에 저장하였으며 열승화방식 프린터(Mitsubishi CP 2000A, Japan)로 인쇄하였다.

5) 관찰 및 분석

① 삼차신경절 하악부위에서의 VIP 면역반응세포의 비율 공초점레이저주사현미경으로 8마리의 각 조직절편의 삼차신경절 하악부위에서 관찰된 전체 세포수와 양성반응 세포수를 계산하여 이를 합산한 후 관찰된 전체 세포수에 대한 양성반응 세포수의 비율을 구하였다.

② 삼차신경절 하악부위에서의 VIP 면역반응세포체에 대한 상대성 형광강도

8마리의 각 조직절편에서 VIP 양성반응세포체가 많은 부위를 선택한 후 5개의 양성세포(적색)를 선택하여 각 세포체의 외형을 스케치(drawing)한 다음 강도측정 프로그램에 의해 형광강도를 측정하여 합산한 후 평균치를 구하였다.

③ 광단층절편에서 VIP 면역반응세포체에 대한 형광강도의 분석

8마리의 각 조직절편에서 VIP 양성반응세포체가 많은 부위를 선택한 후 열승화방식 프린터를 이용하여 칼라인쇄 후 인화지에서 형광강도에 따라 적색(높은 형광강도), 백색(중등도 형광강도), 회색(낮은 형광강도)으로 구분하여 분석 하였다.

④ 광연속절편에서 VIP 면역반응세포체에 대한 형광강도의 분석

8마리의 각 조직절편에서 VIP 양성반응세포체가 많은 부위를 선택한 후 1 μ m 두께의 9개의 광연속상을 열승화방식 칼라프린터를 이용하여 인쇄하여 인화지에서 각 절편의 형광강도를 적색(높은 형광강도), 백색(중등도 형광강도), 회색(낮은 형광강도)으로 구분하여 분석 하였다.

VIP 양성반응세포의 비율과 상대성 형광강도는 평균(M)과 표준편차(SD)를 구하였으며, 정상군과 하치조신경절단군의 계측치는 Student t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

III. 실험결과

1. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 비율

Table 1(A)에서와 같이 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 비율은 정상군이 $8.79 \pm 1.99\%$ 이었고, 하치조신경절단 후 14일군이 $39.16 \pm 5.62\%$, 28일군이

Table 1. Mean percentage of the appearance(A) and relative fluorescence intensity(B) of VIP-IR neurons in trigeminal ganglion (mean \pm S.D.)

Group	(A)	(B)	(% of normal)
normal	8.79 \pm 1.99	134.40 \pm 10.39	(100%)
14 days	39.16 \pm 5.62*	192.88 \pm 14.06*	(143.3%)
28 days	16.25 \pm 2.39*	143.10 \pm 5.02	(106.7%)

* The value is significantly different from normal group (P<0.001).

16.25 \pm 2.39%이었다. 정상군에 비해 신경절단 14일군과 28일군 모두에서 유의성 있는 증가를 보였다(P<0.001).

2. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포체에 대한 상대성 형광강도

Table 1(B)에서와 같이 삼차신경절 하악부위에서 VIP면역반응세포체에 대한 상대성 형광강도는 정상군이 134.40 \pm 10.39이었고, 하치조신경절단 후 14일군이 192.88 \pm 14.06, 28일군이 143.10 \pm 5.02이었다. 정상군과 비교하였을 때 신경절단 후 14일군은 43.3%, 28일군은 6.7%의 증가를 보였다. 정상군과 신경절단 14일군은 유의있는 차를 보였고(P<0.001), 신경절단 28일군은 정상군에 비해 상대성 형광강도는 증가하였으나 유의성을 보이지는 않았다(P>0.05).

3. 광단층절편에서 삼차신경절에 발현되는 VIP 면역반응세포체에 대한 형광강도의 분석

광단층절편에서 삼차신경절에 발현하는 VIP 면역반응세포체에 대한 형광강도의 분석은 정상군과 신경절단 후 28일군에서는 백색(중증도 형광강도)이 가장 많았고, 신경절단 후 14일군에서는 적색(높은 형광강도)이 가장 많았다.

4. 광연속절편에서 삼차신경절에 발현되는 VIP 면역반응세포체에 대한 형광강도의 분석

광연속절편(1 μ m)에서 삼차신경절에 발현하는 VIP 면역반응세포체의 형광강도의 분석은 정상군과 신경절단 후 28일군에서는 적색(높은 형광강도)의 형광강도를 나타내는 세포체가 9개의 절편 중 일부분에서만 관찰된 반면, 신경절단 후 14일군에서는 적색의 형광강도를 나타내는 세포체가 9개의 절편 대부분에서 관찰되었다.

IV. 총괄 및 고안

흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서 VIP 면역반응세포에 대한 분포를 조사한 결과 신경손상 후 양성반응세포가 증가함을 알 수 있었다. 본 연구의 결과를 살펴

보면, 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 비율은 정상군이 8.79%이었고, 신경절단 후 14일군이 39.16%, 28일군이 16.25%를 보였다. Fristad 등¹⁶⁾은 정상 삼차신경절에서는 관찰이 어려웠으나 전자현미경소견에서 양성반응을 보이는 작은 과립들을 관찰할 수 있었으며, 신경손상 후 21일 경과후에는 3~4%의 양성세포가 관찰되었다고 보고하였다. Zhang 등¹⁵⁾은 VIP mRNA를 조사한 실험에서 정상 삼차신경절에서는 7%, 신경손상 후 14일 경과후에는 31%의 증가를 보였으며, 41일 경과 후에도 정상군과 비교하여 유의적인 차이는 보이지 않지만 증가되었다고 보고하였다. 이상의 결과와 비교하여 볼 때 정도의 차이는 있지만 VIP는 정상상태의 삼차신경절에서도 존재하며, 하치조신경손상 후 증가함을 알 수 있었다.

CGRP, NPY와 substance P 등 다른 신경펩타이드(neuropeptides)와 비교하여 보면, 박 등²⁴⁾은 흰쥐 삼차신경절에서 CGRP면역반응세포체의 출현은 정상인 31.7%이었고, 하치조신경을 절단한 후 15일후에는 19.2%로 감소하였다고 보고하였고, 임 등²⁹⁾은 하치조신경손상 후 substance P도 감소하였다고 보고하였다. 반면에 Wakisaka 등²⁷⁾은 neuropeptide Y는 신경손상 후 삼차신경절에서 증가하였다고 하였다. 위의 연구에서와 같이 말초신경손상 후 삼차신경절에서의 증가 또는 감소하는 여러 신경펩타이드의 변화량 및 변화시기에 대한 비교 연구가 필요하리라 생각된다.

공초점레이저주사현미경은 1980년대 중반에 개발되어 Watson³⁴⁾이 치의학영역에서 이 현미경의 응용에 대해 보고한 이후, 그 동안 여러 연구가 진행되어 왔다^{35,36,39)}. 공초점레이저주사현미경은 형광장치를 부착한 형광현미경을 기본으로 하여 레이저선을 광원으로 이용했기 때문에 광원은 한 곳으로 모이는 특성이 있어 정교한 초점을 맺어 선명한 상을 얻을 수 있다. 형광장치가 있어 조직 또는 세포 속의 형광물질이나 인위적으로 표지한 여러 종류의 형광을 서로 다른 색깔로 동시에 추적할 수 있으며, 일반 형광현미경은 시료 전체를 발광시켜 원하지 않은 점으로부터 상의 간섭현상에 의해 선명도가 저하되는 단점이 있는데, 공초점레이저주사현미경은 이러한 문제점을 보완하였다.

본 실험에서는 상대성 형광강도(relative fluorescence intensity), 층별강도(depth cording), 밀도측정(densitometer analysis), 광단층절편(optical single section) 및 광연속절편(optical serial section)을 조사한 다음, 상대성 형광강도, 광단층절편 및 광연속절편 등 3개의 항목을 분석하였다. 층별강도와 밀도측정은 이번 연구 내용에서는 분석의 의미가 약하여 소개만 하였다.

상대성 형광강도는 면역염색에 대한 형광강도를 적색, 백색, 회색 등 여러 색으로 구분하여 나타내어 형광강도를 서로 비교할 수 있는 공초점레이저주사현미경의 특성을 이용하였다. 형광강도를 비교한 본 실험에서 하치조신경손상 후

삼차신경절에서 VIP 면역반응세포에 대한 상대성 형광강도는 정상군이 134.40이었고, 신경절단 후 14일군이 192.88, 28일군이 143.10를 보였다. 그리하여 정상군과 비교하였을 때 신경절단 후 14일군은 43.3%의 증가를 보였으며 정상군에 비해 유의있는 차를 보였다. 28일군은 6.7%의 증가를 보였으나 통계학적으로 유의성을 보이지는 않았다. 오 등³⁷⁾은 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서 발견되는 substance P 면역반응세포체의 형광염색에 대한 형광강도의 정도를 연구하였는데 정상군이 142.8이었고, 신경절단 후 14일군이 84.7, 31일군이 139.6를 보였다고 보고하였다. 따라서 상대성 형광강도는 하치조신경절단 후 14일군이 정상군의 59.5%이었고, 31일이 정상군의 97.8%이었다고 하였다. Fristad 등¹⁶⁾은 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절세포에서 VIP와 substance P의 공존양상을 확인하기 위해 rhodamine과 FITC로 이중염색을 하여 세포질내에서 두 물질의 공존을 확인하였으며, 신경을 절단한 경우 VIP 면역반응 세포의 수가 증가하였으며, 형광강도 또한 정상과 비교하여 강하게 나타났다고 보고하였다. 위의 자료로 보아 하치조신경을 절단했을 경우 삼차신경절에서 면역반응세포의 증가, 감소와 비례하여 면역반응세포의 상대성 형광강도도 증가, 감소함을 알 수 있었다.

공초점레이저주사현미경의 또 하나의 특징은 광단층절편 및 광연속절편에 의한 비교 분석이 가능하다는 것이다. 광원인 레이저선은 표본 내부로 투영될 수 있기 때문에 표본이 여러 개의 얇은 단면(약 1 μ m)으로 주사될 수 있다. 또한 레이저선이 주사하는 표본의 절단면은 기계적인 절편이 아닌 광학적 절편(optical sectioning)이므로 표본을 얇게 제작하지 않아도 선명한 상을 얻을 수 있고 표본의 두께를 여러 절단면으로 주사하여 컴퓨터 프로그램으로 재구성하면 3차원적인 구조를 얻을 수 있다.

본 연구에서 단층광절편을 분석하였을 때, 삼차신경절에 발견하는 VIP면역반응세포체의 형광염색에 대한 형광강도는 정상군과 신경절단 28일군에서는 백색(중증도 형광강도)이, 신경절단 14일군에서는 적색(높은 형광강도)이 가장 많이 관찰되었다. 1 μ m두께로 연속된 광연속절편에서의 형광염색에 대한 형광강도는 신경절단 14일군에서는 적색(높은 형광강도)의 형광강도를 나타내는 세포가 9개의 절편 대부분에서 관찰된 반면, 정상군과 신경절단 28일군에서는 적색(높은 형광강도)의 형광강도를 나타내는 세포가 9개의 절편 일부분에서만 관찰되었다.

오 등³⁷⁾은 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서 발견되는 substance P 면역반응세포체에 대한 광단층절편의 형광염색에 대한 형광강도의 분석에서 정상군에서는 적색(높은 형광강도)이 제일 많았고, 다음이 백색(중증도 형광강도), 회색(낮은 형광강도)의 순서를 보였고, 신경절단 후 14일군은 회색(낮은 형광강도)이 제일 많았고,

다음이 백색, 적색의 순 이었으며, 31일군은 적색이 가장 많았고 다음이 백색, 회색의 순 이었다고 보고하였다. 또 광연속절편의 분석에서는 정상군은 적색(높은 형광강도)이 다수이었고, 다음이 백색, 회색의 순서를 보였으며, 신경절단 후 14일군은 회색이 다수이었고, 다음이 백색, 적색의 순 이었고, 31일군은 절편중에서 적색이 다수이었고 다음이 백색, 회색의 순이었다고 보고하였다.

또한 김과 Wäsle³⁸⁾는 노화된 흰쥐의 삼차신경절 및 삼차신경척수핵교리쪽 부분에 발견하는 NPY 면역반응세포체의 광단층절편의 분석에서 청색(낮은 형광강도)이 제일 많았고, 다음이 황색(중증도 형광강도), 적색(높은 형광강도), 백색(매우 높은 형광강도)의 순으로 형광강도가 매우 높은 백색이 가장 적게 관찰되었다고 하였다. 20개의 광연속절편에서는 백색, 적색 및 황색이 출현하는 경우는 5개이었으며, 황색만 출현하는 경우는 2개이었다고 보고하였다. 위에서 언급한 광단층절편과 광연속절편의 결과를 분석하여 보면, 양성반응세포가 증가함과 더불어 단층 및 연속절편에서의 형광강도도 높아짐을 알 수 있었다.

이상의 결과들을 검토하여 볼 때, 삼차신경의 말초가지를 손상 후 VIP의 분포 및 형광강도 등을 공초점레이저주사현미경으로 관찰한 타 연구자들의 보고가 몇 편 뿐 이어서 자세한 비교는 어려웠으나 하치조신경을 절단했을 경우 삼차신경절에서 VIP 면역반응세포의 증가와 함께 상대성 형광강도가 높아졌음을 알 수 있었다. 앞으로 여러 항목의 다양한 비교 연구가 이루어져서 신경재생, 악안면동통 조절 등의 연구에 기초자료가 되었으면 한다.

V. 결 론

흰쥐에서 하치조신경을 절단했을 때 일차구심성 신경원이 위치하는 삼차신경절에서 VIP의 분포 및 반응의 강도를 공초점레이저주사현미경을 이용하여 연구하였다. 체중 150~200g 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 정상군과 하치조신경을 절단한 후 14일, 28일 경과군으로 배정하였다. 면역형광염색을 위해 1차 항체는 rabbit anti-VIP, 2차 항체는 fluorescein isothiocyanate(FITC) conjugated anti-rabbit IgG를 사용하여 염색하였다. 염색된 표본을 공초점레이저주사현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 비율
삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 비율은 정상군이 $8.79 \pm 1.99\%$ 이었고, 하치조신경절단 후 14일군이 $39.16 \pm 5.62\%$, 28일군이 $16.25 \pm 2.39\%$ 이었다.
2. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포체에 대한 상대성 형광강도
삼차신경절 하악부위에서 VIP면역반응세포체에 대한 상

대성 형광강도는 정상군이 134.40 ± 10.39 이었고, 하치조 신경절단 후 14일군이 192.88 ± 14.06 , 28일군이 143.10 ± 5.02 이었다. 정상군과 비교하였을 때 신경절단 후 14일군은 43.3%, 28일군은 6.7%의 증가를 보였다.

3. 광단층절편에서 삼차신경절에 발현되는 VIP 면역반응 세포체에 대한 형광강도의 분석

광단층절편에서 삼차신경절에 발현되는 VIP 면역반응 세포체에 대한 형광강도의 분석은 정상군과 신경절단 후 28일군에서는 백색(중증도 형광강도)이 가장 많았고, 신경절단 후 14일군에서는 적색(높은 형광강도)이 가장 많았다.

4. 광연속절편에서 삼차신경절에 발현되는 VIP 면역반응 세포체에 대한 형광강도의 분석

광연속절편(1 μ m)에서 삼차신경절에 발현되는 VIP 면역반응 세포체에 대한 형광강도의 분석은 정상군과 신경절단 후 28일군에서는 적색(높은 형광강도)의 형광강도를 나타내는 세포체가 9개의 절편 중 일부분에서만 관찰된 반면, 신경절단 후 14일군에서는 적색의 형광강도를 나타내는 세포체가 9개의 절편 대부분에서 관찰되었다.

위의 결과로 보아 하치조신경을 절단 후 삼차신경절 하악 부위에서 VIP 면역반응세포의 증가와 더불어 상대성 형광강도가 높아졌음을 알 수 있었다.

참고 문헌

- Said SI and Mutt V : Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169: 1217-1218, 1970.
- Fuxe K, Hokfelt T, Said S, and Mutt V : VIP and nervous system: immunohistochemical evidence localization in central and peripheral neurons, particular neurons of the cerebral cortex. *Neurosci Lett* 5: 241-246, 1977.
- Loren I, Emson PC, Fahrenkrug J, Bjorklund A, Alumets J, Hakanson R, and Sundler F : Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neurosci* 4: 1953-1976, 1979.
- Anand P, Gibson SJ, McGregor GP, Blank MA, Ghatei MA, Bacarese-Hamilton AJ, Polak JM, and Bloom SR : A VIP containing system concentrated in the lumbosacral region of human spinal cord. *Nature* 305: 143-145, 1983.
- Salt TE and Hill RG : Neurotransmitter candidates of somatosensory primary afferent fibers. *Neurosci* 10(4): 1083-1103, 1983.
- Tanaka S and Koike T : Vasoactive intestinal peptide suppresses neuronal cell death induced by nerve growth factor deprivation in rat sympathetic ganglion cells in vitro. *Neuropeptides* 26: 103-111, 1994.
- Colbert RA, Balbi D, Johnson A, Bailey JA, and Allen JM : Vasoactive intestinal peptide stimulates neuropeptide Y gene expression and causes neurite extension in PC12 cells through independent mechanisms. *J Neurosci* 14: 7141-7147, 1994.
- Klimaschewski L, Unsicker K, and Heym C : Vasoactive intestinal peptide but not galanin promotes survival of neonatal rat sympathetic neurons and neurite outgrowth of PC12 cells. *Neurosci Lett* 195: 133-136, 1995.
- McGregor GP, Gibson SJ, Sabate IM, Blank MA, Christofides ND, Wall PD, Polak JM, and Bloom SR : Effect of peripheral nerve section and nerve crush on spinal cord neuropeptides in the rat: increased VIP and PHI in the dorsal horn. *Neurosci* 13: 207-216, 1984.
- Shehab SAS and Atkinson ME : Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases in the spinal cord after peripheral axotomy of the sciatic nerve originate from primary afferent neurons. *Brain Res* 372: 37-44, 1986a.
- Shehab SAS and Atkinson ME : Vasoactive intestinal polypeptide increases in areas of the dorsal horn of the spinal cord from which other neuropeptides are depleted following peripheral axotomy. *Exp Brain Res* 62: 422-430, 1986b.
- Doughty SE, Atkinson ME, and Shehab SAS : A quantitative study of neuropeptide immunoreactive cell bodies of primary afferent sensory neurons following rat sciatic nerve peripheral axotomy. *Regul Pept* 35: 59-72, 1991.
- Anand P, Ghatei MA, Christofides ND, Blank MA, McGregor GP, Morrison JFB, Scaravilli F, and Bloom SR : Differential neuropeptide expression after visceral and somatic nerve injury in the cat and rat. *Neurosci Lett* 128: 57-60, 1991.
- Zhang X, Bean AJ, Wiesenfeld-Hallin Z, and Hokfelt T : Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord- IV. Effects of peripheral axotomy with special reference to neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine. *Neurosci* 64(4): 917-941, 1995.
- Zhang X, Ji RR, Arvidsson J, Lundberg JM, Bartfai T, Bedecs K, and Hokfelt T : Expression of peptides, nitric oxide synthase and NPY receptor in trigeminal and nodose ganglia after nerve lesions. *Exp Brain Res* 111: 393-404, 1996.
- Fristad I, Jacobsen EB, and Hals Kvinnsland I : 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* 43: 183-189, 1998.
- Atkinson ME and Shehab SAS : Peripheral axotomy of the rat mandibular trigeminal nerve leads to an increase in VIP and decrease of other primary afferent neuropeptides in the spinal trigeminal nucleus. *Regul Pept* 16: 69-82, 1986.
- Umemoto S, Noguchi K, Kawai Y, and Senba E : The expression of neuropeptides and their mRNAs in the trigeminal mesencephalic nucleus following masseteric nerve transection. *Molecul Brain Res* 23: 93-99, 1994.
- Suzuki N, Hardebo JE, and Owman C : Trigeminal fibre collaterals storing substance P and calcitonin gene-related peptide associate with ganglion cells containing cholin acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide in the sphenopalatine ganglion of the rat. An axon reflex modulating parasympathetic ganglionic activity? *Neurosci* 30(3): 595-604, 1989.
- Wakisaka S, Ichikawa H, Nishikawa S, Matsuo S, Takano Y, and Akai M : Immunohistochemical observation on the correlation between substance P and vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivities in the feline dental pulp. *Archs oral Biol* 32: 449-453, 1987.
- 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.

22. Fristad I, Heyeraas KJ, Jonsson R, and Hals Kvinnsland I : Effect of inferior alveolar nerve axotomy on immune cells and nerve fibres in young rat molars. *Archs Oral Biol* 40: 1053-1062, 1995.
23. Sasaki Y, Wakisaka S, and Kurisu K : Effect of peripheral axotomy of the inferior alveolar nerve on the level of neuropeptide Y in rat primary afferent neuron. *Brain Res* 664: 108-114, 1994.
24. 박종섭, 이승표, 백기석 : 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서의 calcitonin gene-related peptide 면역반응세포의 분포에 관한 연구. *대한구강해부학회지* 19(1): 1-12, 1995.
25. Fristad I, Heyeraas KJ, and Hals Kvinnsland I : Neuropeptide Y expression in the trigeminal ganglion and mandibular division of the trigeminal nerve after inferior alveolar nerve axotomy in young rats. *Exp Neurol* 142: 276-286, 1996.
26. Wakisaka S, Takikita S, Sasaki Y, Kato J, Tabata MJ, and Kurisu K : Cell size-specific appearance of neuropeptide Y in the trigeminal ganglion following peripheral axotomy of different branches of the mandibular nerve of the rat. *Brain Res* 620: 347-350, 1993.
27. Wakisaka S, Sasaki Y, and Kurisu K : Temporal analysis of neuropeptide Y expression in the rat trigeminal ganglion following peripheral axotomy of the inferior alveolar nerve. *Neurosci Lett* 188: 49-52, 1995.
28. Wakisaka S, Takikita S, Youn SH, and Kurisu K : Partial coexistence of neuropeptide Y and calbindin D28k in the trigeminal ganglion following peripheral axotomy of the inferior alveolar nerve in the rat. *Brain Res* 707: 228-234, 1996.
29. 임영설, 김명국, 백기석 : 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서의 Substance P 면역반응세포의 분포에 관한 연구. *대한구강해부학회지* 21(2): 153-165, 1997.
30. Shotton DM : Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. *J Cell Sci* 94: 175-206, 1989.
31. 김명국 : 공초점레이저 주사현미경. *치과임상* 192: 18-21, 1997.
32. 하권수, 이지원 : Principle and applications of laser scanning confocal microscope. *아주의학* 2(2): 91-95, 1997.
33. Brakenhoff GJ, van der Voort HTM, van Spronsen EA, Linnemans WAM, and Nanninga N : Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature* 317: 748-749, 1985.
34. Watson TF : Application of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Brit Dent J* 171: 287-291, 1991.
35. Ito H, Takekoshi T, Miyuchi M, Ogawa I, Takata T, Nikai H, and Takemoto K : Three-dimensional appearance of Langerhans cells in human gingival epithelium as revealed by confocal laser scanning microscopy. *Archs Oral Biol* 43: 741-744, 1998.
36. Chantawiboonchai P, Warita H, Ohya K, and Soma K : Confocal laser scanning microscopic observations on the three-dimensional distribution of oxytalan fibres in mouse periodontal ligament. *Arch Oral Biol* 43: 811-817, 1998.
37. 오순이, 김명국, 백기석 : 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서의 Substance P 면역반응세포의 분포에 관한 공초점레이저주사현미경적 연구. *대한구강해부학회지* 22(2): 113-128, 1998.
38. 김명국, Wäslé H : 노화된 흰쥐 삼차신경절 및 삼차신경척수핵 꼬리쪽 부분에서의 Neuropeptide Y 면역반응세포의 형광강도에 관한 공초점레이저주사현미경적 연구. *대한구강해부학회지* 22(2): 35-56, 1998.
39. 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.

사진부도 설명

- Fig. 1. Appearance of vasoactive intestinal polypeptide(VIP) immunoreactive cells in the mandibular part of the trigeminal ganglion. * Fig. 1 - 4 : bar = 40 μ m
- (A) Normal rat.
 - (B) 14 days after inferior alveolar nerve axotomy, note the increase number of VIP immunoreactive cells.
 - (C) 28 days after inferior alveolar nerve axotomy.
- Fig. 2. Confocal laser scanning microscopic image showing degree of the fluorescence intensity for VIP immunoreactive cells in the mandibular part of the trigeminal ganglion.
- (A) Normal rat.
 - (B) 14 days after inferior alveolar nerve axotomy, note a large number of the red cell bodies and white, gray in order.
 - (C) 28 days after inferior alveolar nerve axotomy.
- Fig. 3. Densitometer analysis of fluorescence intensity of the VIP immunoreactive cells in the mandibular part of the trigeminal ganglion.
- (A) Normal rat.
 - (B) 14 days after inferior alveolar nerve axotomy, note the high fluorescence intensity.
 - (C) 28 days after inferior alveolar nerve axotomy.
- Fig. 4. Depth coding of fluorescence intensity of the VIP immunoreactive cells in the mandibular part of the trigeminal ganglion.
- (A) Normal rat : red - 0 μ m, yellow - 3 μ m, green - 6 μ m, blue - 12 μ m.
 - (B) 14 days after inferior alveolar nerve axotomy ; red - 0 μ m, yellow - 2.8 μ m, green - 5.5 μ m, blue - 11 μ m.
 - (C) 28 days after inferior alveolar nerve axotomy ; red - 0 μ m, yellow - 3.3 μ m, green - 6.5 μ m, blue - 13 μ m.
- Fig. 5. Confocal laser scanning micrograph of 9 optical serial section(1 μ m thickness) in the mandibular part of the trigeminal ganglion. bar = 200 μ m
- (A) Normal rat.
 - (B) 14 days after inferior alveolar nerve axotomy.
 - (C) 28 days after inferior alveolar nerve axotomy.

사진부도 ①

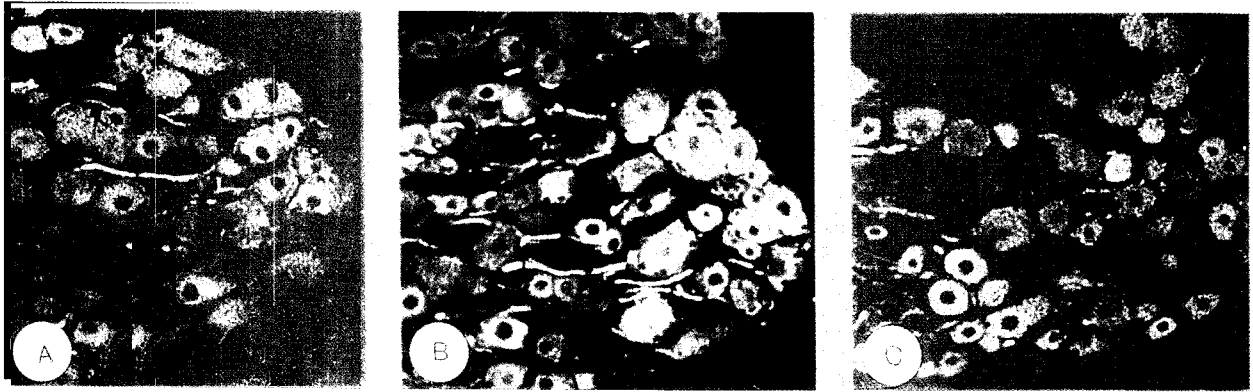


Fig. 1

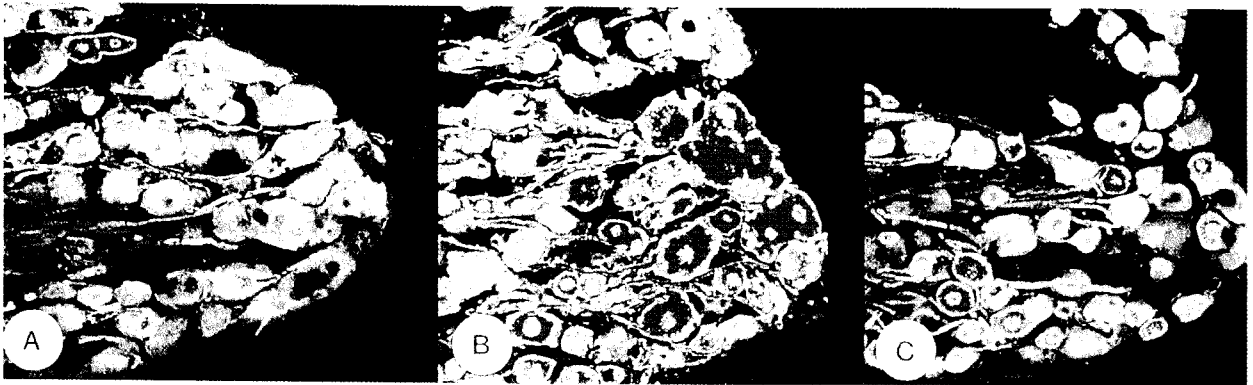


Fig. 2

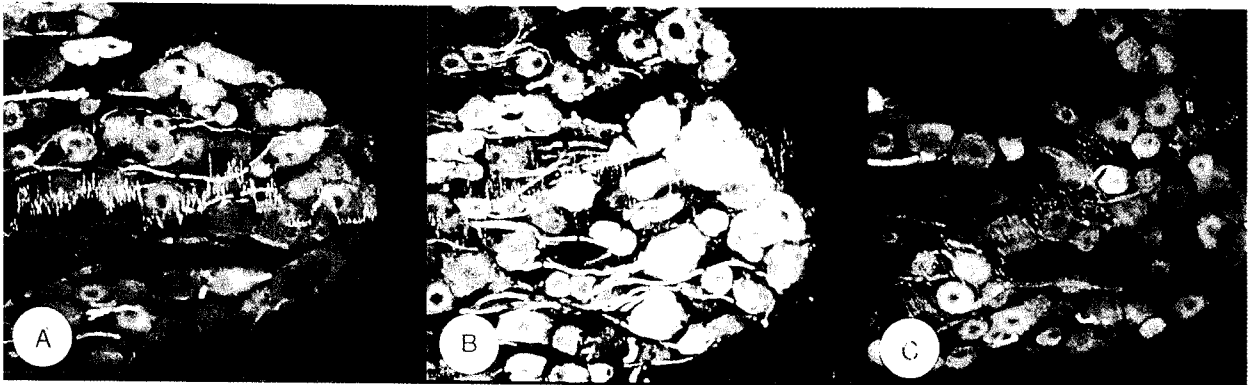


Fig. 3

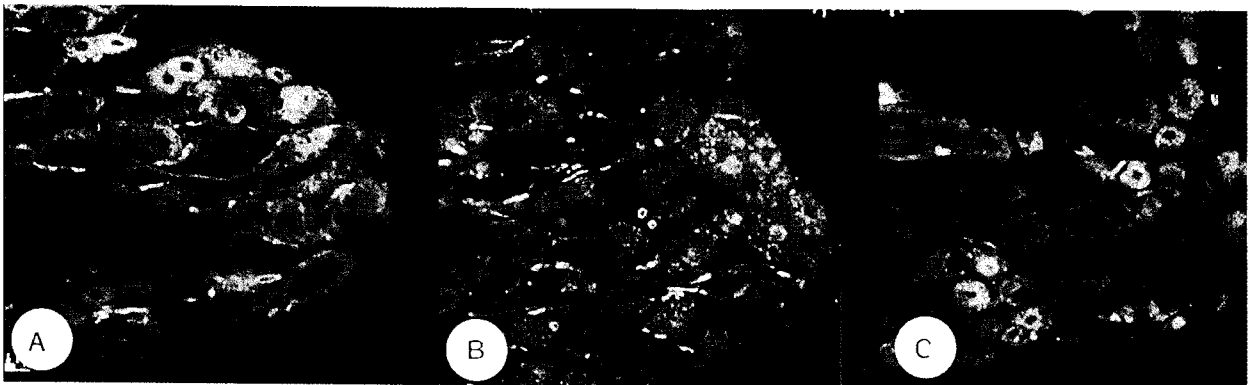


Fig. 4

사진부도 ②

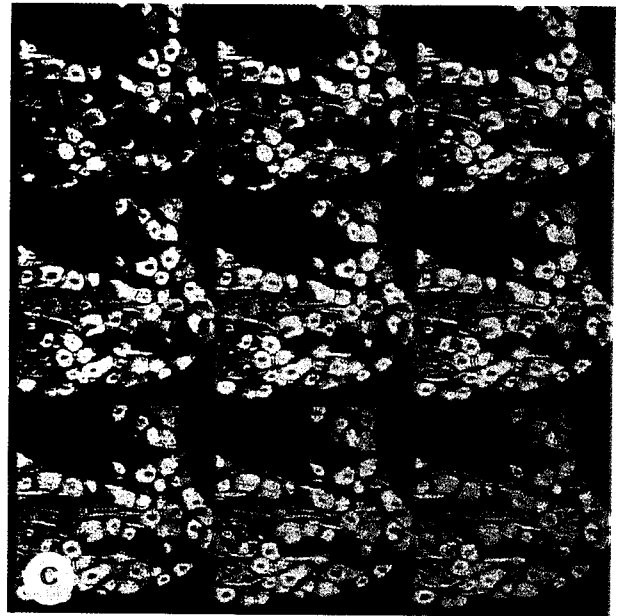
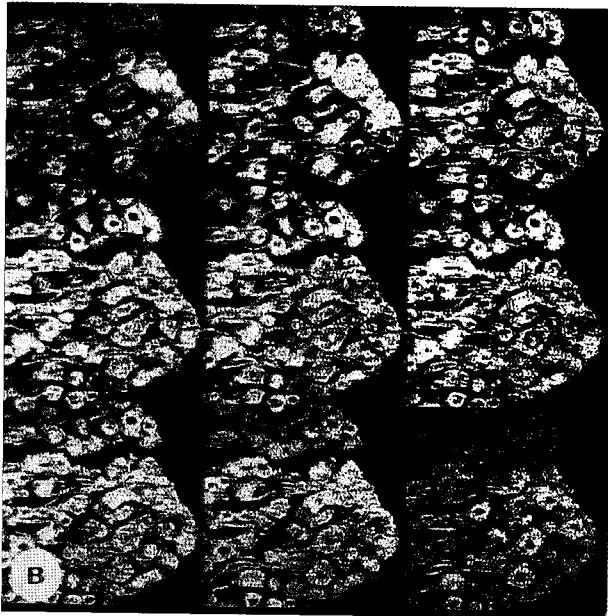
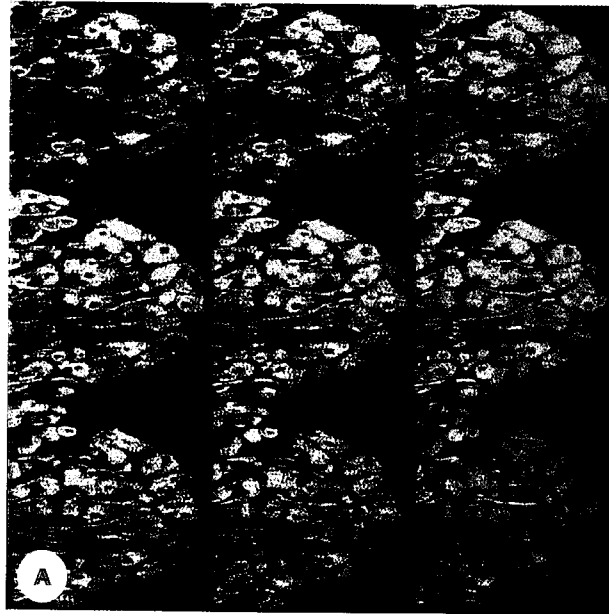


Fig. 5