

치수제거 후 흰쥐 삼차신경절에서 VIP 면역반응세포의 변화: 공초점레이저주사현미경적 연구

김흥중* · 김승재* · 박주철* · 이창섭 · 이상호

조선대학교 치과대학 구강생물학연구소*, 소아치과학교실

국문초록

말초신경 손상에 의한 VIP의 변화를 연구하기 위해 흰쥐 하악대구치 치수제거 후 삼차신경절에서 VIP의 분포 및 반응강도를 공초점레이저주사현미경을 이용하여 관찰하였다. 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대조군과 하악대구치 치수제거 후 14일군으로 분리하여 희생시켰다. 1차 항체로 rabbit anti-VIP, 2차 항체로 fluorescein isothiocyanate(FITC) conjugated anti-rabbit IgG를 사용하여 면역형광염색을 시행한 후 공초점레이저주사현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 양성반응세포의 비율은 대조군에서 7.40%를, 실험군에서는 28.42%를 보였다. 대조군에 비해 실험군에서 양성반응세포의 증가를 보였다.
2. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포체에 대한 상대성 형광강도는 대조군에서 87.78을, 실험군에서는 138.65를 보였다. 대조군과 비교하였을 때 실험군에서 상대성 형광강도의 증가를 보였다.
3. 실험군의 광연속절편(1 μ m) 관찰에서 VIP 면역반응세포는 9개의 절편 대부분에서 강하게 나타났다. 축삭의 면역반응을 살펴보면, 대조군의 축삭에서는 약한 반응을 보였으며, 실험군의 축삭에서는 강한 면역반응을 보였다. 또한 양성반응 세포체의 크기는 20~25 μ m의 중간 크기의 세포체에서 강한 면역반응을 보였다.

위의 결과로 보아 치수제거 후에 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 증가와 함께 상대성 형광강도가 높아졌음을 알 수 있었다.

주요어 : 삼차신경절, 치수제거, VIP, 공초점레이저주사현미경

I. 서 론

치아삭제, 치수제거, 치아발거 등의 치과 시술 후, 구강 및 안면영역으로부터 전달되는 감각섬유의 일차감각신경원이 위치하는 삼차신경절(trigeminal ganglion)에서 여러 신경전달물질의 변화에 대한 연구들이 삼차신경통 및 신경재생 기전의 규명을 위해 진행되어 오고 있다¹⁻⁴⁾. 삼차신경절세포의 말초가지는 눈신경, 상악신경, 하악신경으로 구성되며, 이들 감각신경의 세포체는 신경절 내에서 해부학적으로 분리되어 위치하고 있다. 특히 신경절의 하악신경부위는 눈신경영역, 상악신경영역과 확연히 구분되어 있기 때문에 하치조신경절단, 하악치아 손상 등의 시술에 따른 calcitonin gene-related peptide

(CGRP), substance P, neuropeptide Y(NPY), vasoactive intestinal polypeptide(VIP) 등 신경전달물질들의 변화에 대한 연구의 모델로 많이 이용되고 있다^{2,5-8)}.

VIP는 1970년 Said와 Mutt⁹⁾가 돼지 십이지장의 내분비세포에서 처음 발견한 28개의 아미노산으로 구성된 신경전달물질로, 뇌와 척수 등의 신경조직에 광범위하게 분포되어 있으며, Fuxe 등¹⁰⁾, Loren 등¹¹⁾ 및 Salt와 Hill¹²⁾의 여러 연구자들에 의해 동통조절의 기능을 갖고 있음이 밝혀졌다. 또한 Tanaka와 Koike¹³⁾ 및 Klimaschewski 등¹⁴⁾은 말초신경손상과 관련하여 VIP는 신경성장인자를 제거한 경우에 신경세포의 죽음을 방지할 뿐 아니라, 축삭의 성장과 재생을 촉진시킨다고 보고하였다.

치아손상, 말초신경절단 등 신경손상 후 신경전달물질의 변

*이 논문은 1999년도 조선대학교의 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

화를 관찰하는데는 면역조직화학방법이 유용하게 이용된다. 면역조직화학적 방법으로 특정한 항원(신경전달물질)의 위치를 알기 위해 지금까지는 과산화효소, 형광염료 등 여러 표지물질을 이용하여 염색하여 광학현미경, 전자현미경 및 형광현미경으로 주로 관찰하였다. 최근에 공초점레이저주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)이 개발되어 면역조직화학연구에서 면역반응세포의 3차원상 및 형광강도 분석에 이용되고 있다.

CLSM은 1980년대 중반에 개발되어 Watson¹⁵⁾이 치의학영역에서 이 현미경의 응용에 대해 보고한 이후, 그 동안 여러 연구가 진행되어 왔다¹⁶⁻¹⁸⁾. CLSM은 형광장치를 부착한 형광현미경을 기본으로 하여 레이저선을 광원으로 이용했기 때문에 정교한 초점을 맺어 선명한 상을 얻을 수 있다. 또한 CLSM은 표지한 여러 종류의 형광물질이나 조직 또는 세포 속의 형광물질을 서로 다른 색깔로 동시에 추적할 수 있으며, 일반 형광현미경에서 시료 전체를 발광시켜 원하지 않은 점으로부터 상의 간섭현상에 의해 선명도가 저하되는 단점이 보완되었다.

구강 및 악안면영역의 감각과 밀접한 관련이 있는 삼차신경의 가지에 손상을 가한 후 VIP의 변화에 대한 연구를 살펴보면, 최근에 Zhang 등¹⁹⁾과 Fristad 등¹⁷⁾의 보고와 같이 미미한 바, 더 자세한 분포변화 및 형광강도 분석 등이 필요하여 본 연구를 시행할 필요가 있다.

본 저자는 구강영역의 통통의 한 연구 모델로 흰쥐 하악대구치의 치수를 제거한 후에 일차구심성 신경원이 위치하는 삼차신경절 하악부위에서 통각 전달에 있어 중요한 신경전달물질인 VIP의 분포 및 형광강도를 CLSM을 이용하여 연구하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

무게 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 암, 수 구분 없이 사용하였으며, 대조군 및 실험군(치수제거 후 14일군)에 각 6마리씩 총 12마리를 배정하였다.

2. 치수제거 및 조직처리

치수제거 과정은 다음과 같다. Ether로 흡입마취 후 ketamine HCl(150mg/kg, 유한양행)로 복강내 주사하여 전신 마취시켰다. 고속핸드피스(high speed handpiece)를 이용하여 하악대구치의 치관을 삭제하여 치수를 노출시켰다. 노출된 치수를 파일을 이용하여 제거 후 z.o.e로 밀봉한 다음, 희생시킬 시기까지 사육하였다.

치수제거 후 14일 경과 후에 대조군과 실험군을 각각 희생시켰다. 조직처리 과정은 다음과 같다. Ether로 흡입마취 후 ketamine HCl(150mg/kg, 유한양행)을 복강내로 마취한 다음,

흉강을 열고 좌심실에 삼관을 삽입하여 0.3% heparin이 함유된 식염수로 관류하고 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 300ml정도 사용하여 관류고정을 하였다. 좌측 삼차신경절을 적출한 후 4℃의 동일 고정액에서 24시간 동안 후고정하였다. 냉동절편을 얻기 위하여 4℃의 30% sucrose에 12시간 처리한 후 O.C.T compound에 포매하여 -20℃의 Cryostat에서 약 20 μ m의 두께로 박절하였다. 박절한 절편은 gelatin coated slide에 부착하여 cold dryer로 2시간 건조 후, 염색시까지 냉동고에 보관하였다.

3. 면역형광염색 및 관찰

면역형광염색과정은 다음과 같다.

- 1) rinse with 0.1M PBS : 2min. \times 3times
- 2) 10% normal goat serum in 0.1M PBS : 30min.
- 3) primary antibody (rabbit anti-VIP, 1 : 8,000 Sigma, USA) : 24~48hrs at 4 $^{\circ}$ C
- 4) rinse with PBS : 2min. \times 3times
- 5) secondary antibody (FITC-conjugated anti-rabbit IgG, 1 : 80, Sigma, USA) : 60~90min. at room temp.
- 6) rinse with PBS : 2min. \times 3times
- 7) mounting & coverslip : Gel/Mount*(Biomedica)

각 군의 서로 다른 절편에서의 형광강도를 표준화하기 위해서 각 형광염색시 각 군의 절편을 동시에 처리하였다. 면역형광염색을 시행한 절편은 기초과학지원연구소(전남대 소재)의 CLSM(Leica TCS NT, Germany)를 사용하여 관찰하였다. 광원으로 488nm를 방출하는 아르곤레이저(Ar Laser)와 해상도는 1024 \times 1024를 이용하였다. 자동화된 광절편 프로그램에 의해 광연속절단(optical serial sectioning)을 하여 연속상을 얻었다. 관찰한 화상은 광디스크에 저장하였으며 열승화방식 프린터(Mitsubishi CP 2000A, Japan)로 인쇄하였다.

VIP 양성반응세포의 비율은 삼차신경절 하악부위에서 관찰된 전체 세포수에 대한 양성반응 세포수의 비율을 구하였으며, VIP 면역반응세포에 대한 상대성 형광강도는 강도측정 프로그램에 의해 형광강도를 측정하였다.

III. 실험결과

1. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 양성반응세포의 비율

Table 1에서와 같이 삼차신경절 하악부위에서 VIP 양성반응세포의 비율은 대조군에서 7.40%를, 실험군(치수제거 후 14일군)에서는 28.42%를 보였다. 대조군에 비해 실험군에서 양성반응세포의 증가를 보였다(Fig. 1-A,B).

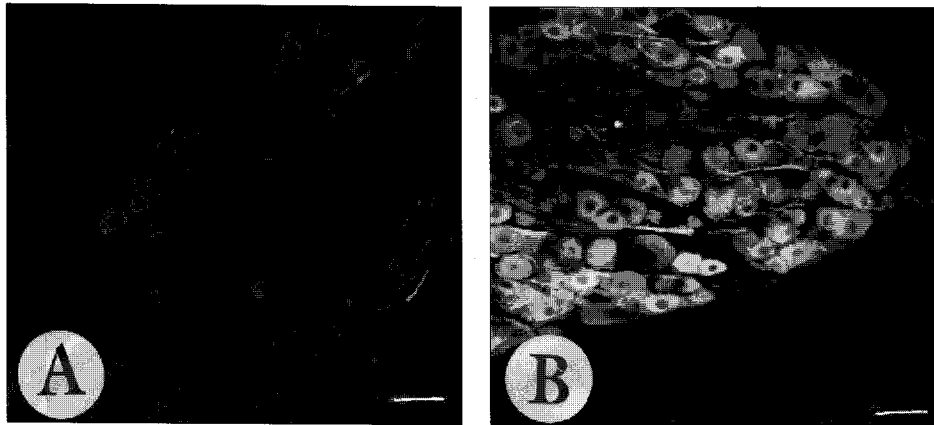


Fig. 1. VIP-IR cells in the mandibular part of the trigeminal ganglion. (a): control group, (b): experimental group(14 days after pulp extirpation), note a large number of VIP-IR cells. bar = 20 μ m

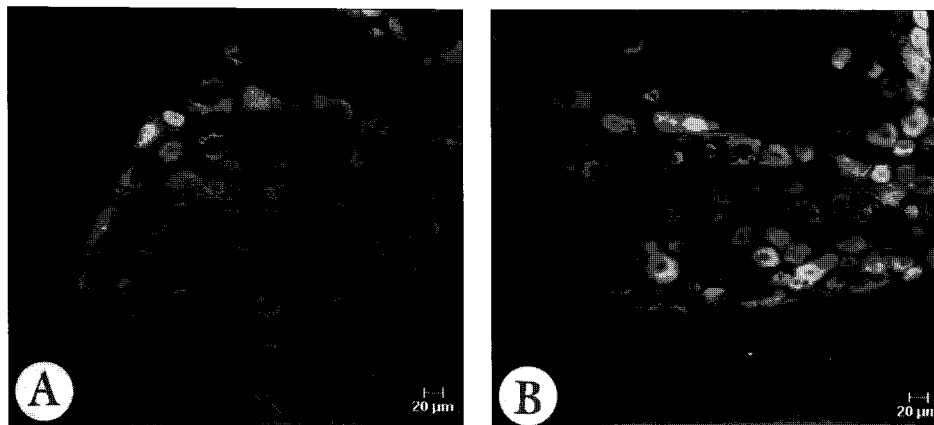


Fig. 2. Degree of the fluorescence intensity for VIP-IR cells in the mandibular part of the trigeminal ganglion. (a): control group, (b): experimental group(14 days after pulp extirpation), note a large number of the yellow cell bodies with high fluorescence intensity.

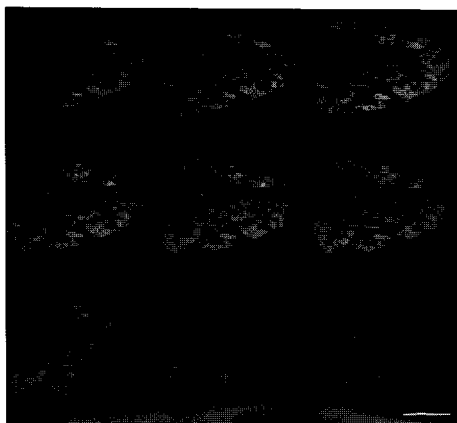


Fig. 3. 9 optical serial images(each 1 μ m in thickness) in the mandibular part of the trigeminal ganglion of experimental group(14 days after pulp extirpation). Most of the 9 sections showed high fluorescence intensity. bar = 100 μ m

Table 1. Positive ratio and relative fluorescence intensity of VIP-IR cells in mandibular part of rat trigeminal ganglion

group	positive ratio (%)	relative fluorescence intensity
control	7.40	87.78
experimental (14 days)	28.42	138.65

2. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포에 대한 상대성 형광강도

Table 1에서와 같이 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응 세포체에 대한 상대성 형광강도는 대조군에서 87.78를, 실험군에서는 138.65를 보였다. 대조군과 비교하였을 때 실험군에서 상대성 형광강도의 증가를 보였다(Fig. 2-A, B).

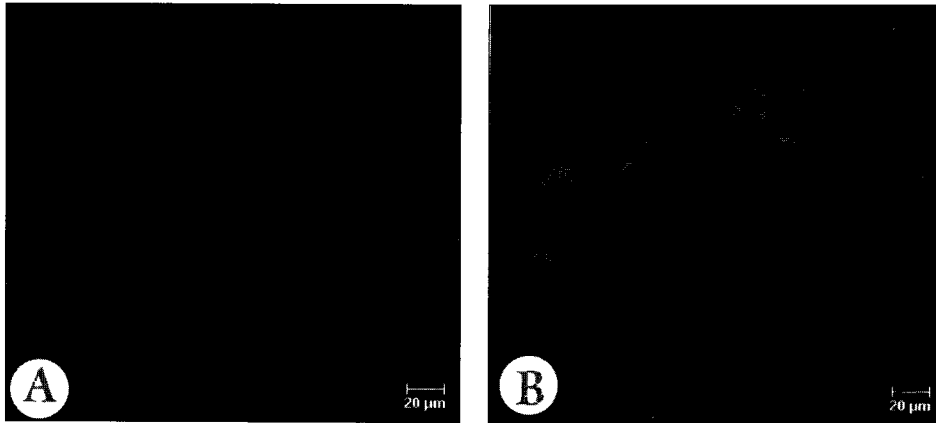


Fig. 4. High magnification of control and experimental(14 days after pulp extirpation) groups. (a); control group, (b); experimental group(14 days after pulp extirpation). Axons of the experimental group displayed greater VIP-IR than in the control group, and the positive cells were mainly of medium size.

3. 광연속절편 및 양성반응세포의 관찰

실험군의 광연속절편(1μm) 관찰에서 VIP 면역반응세포는 9 개의 절편 대부분에서 강하게 나타났다(Fig. 3). 축삭의 면역반응을 살펴보면, 대조군의 축삭에서는 약한 반응을 보였으나, 실험군의 축삭에서는 강한 면역반응을 보였다. 또한 양성반응 세포체의 크기를 살펴보면, 20~25μm의 중간 크기의 세포체에서 강한 면역반응을 보였다(Fig. 4-A, B).

IV. 총괄 및 고안

CLSM은 시료 중 원하는 지점에 광원인 laser와 검출기의 초점을 동시에 일치시켜 초점에서 벗어난 image에 의한 간섭 현상을 최소화함으로써 image의 선명도를 극대화시킨 현미경이다. 광원과 검출기의 초점을 동시에 시료의 한 점에 일치시킴으로써 기존의 현미경을 통해 얻을 수 없었던 다양한 종류의 정보를 얻을 수 있다.

CLSM은 치의학, 의학, 약학, 생명과학, 반도체 등 다양한 분야에서 이용 될 수 있으며, 분석하고자 하는 목적에 따라 시료를 고정한 후 관찰하는 방법과, 살아 있는 세포를 직접 관찰하는 방법으로 크게 나눌 수 있다^{15,20}.

시료를 고정한 다음 관찰하는 방법은 3차원 입체상(3-D construction)을 이용하는 방법으로 CLSM과 일반형광현미경을 구분해 주는 가장 중요한 특징 중의 하나이다. CLSM은 광학적 절단(optical sectioning)을 기본적 특징으로 가지고 있기 때문에 시료를 0.1μm에서 수 μm까지 광학적으로 연속적인 절편을 만들 수 있다. 3차원 입체상을 통해 얻을 수 있는 정보는 다양하지만 가장 널리 이용되고 있는 것을 설명하면 크게 3가지로 나눌 수 있다. 첫째는 특정물질의 세포내에서의 위치(intra-cellular localization)를 정확히 결정할 수 있다는 점이다. 둘째는 동시발현(colocalization)인데, 두 가지 이상의 물질을

이용하여 염색할 경우 CLSM은 3개의 분리된 PMT(photo-multiplier detector)와 2가지 이상의 laser를 갖추고 있어서 각각의 image를 분리해서 관찰할 수 있다. 셋째는 막단백질의 세포내 이동을 관찰할 수 있다는 점이다.

CLSM이 갖는 또 하나의 특징은 세포의 변화를 실시간(real-time)으로 관찰할 수 있다는 점이다. 단세포 수준에서 관찰하기 위해서는 세포내 물질을 형광물질로 염색하는 것이 필수적인데, 일반적으로 2가지 방법이 이용되고 있다. 첫째는 형광물질에 세포막을 통과할 수 있는 유도체를 붙여 세포막을 직접 통과시키는 방법이다. 이러한 방법은 Ca²⁺의 정량 변화를 분석하거나, pH 변화를 측정하는데 이용된다. 두 번째는 세포내에 형광물질을 직접 주입하는 방법인데 주로 미세주입기(microinjector)를 이용한다. 이 방법을 통해 분석가능한 것에는 cAMP 정량 변화 분석, 세포골격의 율동적 변화 등이 있다.

본 실험에서는 CLSM을 이용하여 VIP 양성반응세포의 분포, 상대성 형광강도, 광연속절편 등 세 개의 항목을 주로 분석하였다. 또한 일반형광현미경으로는 빛의 간섭으로 인하여 정확한 관찰이 어려웠던 축삭의 반응정도도 보완하였다.

하악대구치 치수제거 후 삼차신경절에서 VIP 면역반응세포에 대한 분포를 조사한 결과 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 비율은 대조군에서 7.40%를, 치수제거 후 14일 군에서 28.42%를 보였다. Zhang 등¹⁹은 VIP mRNA의 발현을 조사한 실험에서 정상에서는 7%, 하치조신경 절단 후 14일 경과군에서는 31%로 증가를 보였으며, 41일 경과 후에도 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 대조군과 비교하여 증가를 보였다고 보고하였다. Fristad 등¹⁷은 정상의 삼차신경절에서 광학현미경으로는 관찰이 어려웠으나 전자현미경소견에서 VIP 양성반응을 보이는 작은 과립들을 관찰할 수 있었으며, 말초신경손상 후에는 광학현미경에서도 양성세포를 관찰할 수 있다고 보고하였다. 이상의 결과로 볼 때, VIP는 정상상태의 삼차신경절에서도 존재하며, 치수제거와 신경절단 같은 말초신경손상 후 증가함을 알 수 있었다.

면역염색에 대한 형광강도를 수치화 할 수 있는 CLSM의 특성을 이용하여 대조군과 실험군의 상대성 형광강도를 비교하였다. 본 실험에서 치수제거 후 삼차신경절에서 VIP 면역반응세포에 대한 상대성 형광강도는 대조군에서 87.78을, 치수제거 후 14일군에서 138.65를 보였다. 대조군과 비교하였을 때 실험군에서 58%의 증가를 보였다. 오 등²¹⁾은 하치조신경을 절단한 후 substance P 면역반응세포의 형광강도를 조사하였는데 대조군에서 142.8을, 신경절단 후 14일군에서 84.7을, 31일군에서 139.6을 보여 상대성 형광강도는 하치조신경절단 후 14일군이 대조군의 59.5%이었고, 31일군이 대조군의 97.8%이었다고 하였다. Fristad 등¹⁷⁾은 하치조신경을 절단한 후 VIP 면역반응 세포의 수가 증가하였으며, 형광강도 또한 정상과 비교하여 강하게 나타났다고 보고하였다. 위의 실험들로 보아 치아손상을 포함한 말초신경손상 후 삼차신경절에서 형광강도는 면역반응세포수의 증가 및 감소와 비례하여 변함을 알 수 있었다.

조직세포관찰에 있어 CLSM의 또 하나의 특징은 표본을 여러 개의 얇은 단면(약 1 μ m)으로 광학적 절단을 하여 광연속절편을 구성한 후 여러 분석이 가능하다는 것이다. 본 연구에서 1 μ m두께로 연속된 광연속절편에서의 형광염색에 대한 형광강도는 치수제거 후 14일군에서 9개의 절편 대부분에서 강한 반응을 보였는데, 이는 반응이 세포체 전체에 강하게 발현됨을 의미한다.

위의 결과에서와 같이, 삼차신경의 말초가지 손상의 모델로써 하악대구치 치수제거 후에 삼차신경절에서 VIP의 분포 및 형광강도 등을 연구한 결과 치수제거 후에 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 증가와 함께 상대성 형광강도가 높아졌음을 알 수 있었다. Fristad 등²⁾은 흰쥐의 하치조신경을 절단 후 삼차신경절에서 NPY의 증가와 더불어 통통전달물질인 substance P의 감소가 동시에 일어난다고 하였는데, 이는 유해자극시 VIP와 NPY가 일시적으로 다른 신경전달물질의 조절에 관여할 것으로 사료된다. 따라서 치과치료에서 치수를 제거한 후 통증이 있는 경우 VIP가 이에 영향을 미치는 것으로 생각되나 그의 기능이 아직 정립되지 않은 상태이므로 앞으로 생리학 접근과 더불어 연구가 이루어져야 할 것이다. 치수제거에 의한 VIP의 변화를 다른 동통 관련 신경전달물질과 비교함으로써 삼차신경통의 기전을 이해하고, 나아가서는 악안면영역의 동통조절에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

흰쥐의 하악대구치 치수를 노출시킨 후 구강 및 안면영역의 일차구심성 신경원이 위치하는 삼차신경절에서 VIP의 분포 및 반응강도를 연구하였다. 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 대조군과 실험군(치수제거 후 14일군)에 각각 6마리씩 배정하였다. 하악대구치의 치수를 제거 후 14일 후에 대조군과 실험군을 희생시켰다. 조직처리 후, 1차 항체로 rabbit

anti-VIP, 2차 항체로 fluorescein isothiocyanate : FITC) conjugated anti-rabbit IgG를 사용하여 면역형광염색을 시행하였다. 염색된 표본을 CLSM으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 양성반응세포의 비율은 대조군에서 7.40%를, 실험군에서는 28.42%를 보였다. 대조군에 비해 실험군에서 양성반응세포의 증가를 보였다
2. 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포체에 대한 상대성 형광강도는 대조군에서 87.78을, 실험군에서는 138.65를 보였다. 대조군과 비교하였을 때 실험군에서 상대성 형광강도의 증가를 보였다.
3. 실험군의 광연속절편(1 μ m) 관찰에서 VIP 면역반응세포는 9개의 절편 대부분에서 강하게 나타났다. 축삭의 면역반응을 살펴보면, 대조군의 축삭에서는 약한 반응을 보였으나, 실험군의 축삭에서는 강한 면역반응을 보였다. 또한 양성반응 세포체의 크기는 20~25 μ m의 중간 크기의 세포체에서 강한 면역반응을 보였다.

위의 결과로 보아 치수제거 후에 삼차신경절 하악부위에서 VIP 면역반응세포의 증가와 함께 상대성 형광강도가 높아졌음을 알 수 있었다. 치수를 제거 후 VIP가 통증조절에 영향을 미치는 것으로 생각되나 그의 기능이 아직 정립되지 않은 상태이므로 앞으로 생리학적인 기전에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 박종섭, 이승표, 백기석 : 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서의 calcitonin gene-related peptide 면역반응세포의 분포에 관한 연구. 대한구강해부학회지 19(1):1-12, 1995.
2. Fristad I, Heyeraas KJ, Kvinnsland IH : 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.
3. Sasaki Y, Wakisaka S, 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.
4. Wakisaka S, Ichikawa H, Nishikawa S, et al. : 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.
5. 임영설, 김명국, 백기석 : 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서의 Substance P 면역반응세포의 분포에 관한 연구. 대한구강해부학회지 21(2):153-165.

- 1997.
6. Atkinson ME, 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.
 7. Wakisaka S, Takikita S, Youn SH, 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.
 8. Wakisaka S, Takikita S, Sasaki Y, et al. : 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.
 9. Said SI, Mutt V : Polypeptide with broad biological activity; isolation from small intestine. *Science* 169:1217-1218, 1970.
 10. Fuxe K, Hokfelt T, Said S, Mutt V : VIP and nervous system: immunohistochemical evidence localization in central and peripheral neurons, particularly neurons of the cerebral cortex. *Neurosci Lett* 5:241-246, 1977.
 11. Loren I, Emson PC, Fahrenkrug J, et al. : Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neurosci* 4:1953-1976, 1979.
 12. Salt TE, Hill RG : Neurotransmitter candidates of somatosensory primary afferent fibers. *Neurosci* 10(4):1083-1103, 1983.
 13. Tanaka S, 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.
 14. Klimaschewski L, Unsicker K, 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.
 15. Watson TF : Application of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Brit Dent J* 171:287-291, 1991.
 16. 김명국, Wässle H : 노화된 흰쥐 삼차신경절 및 삼차신경 척수핵 꼬리쪽 부분에서의 Neuropeptide Y 면역반응세포의 형광강도에 관한 공초점레이저주사현미경적 연구. *대한구강해부학회지* 22(2):35-56, 1998.
 17. Fristad I, Jacobsen EB, Kvinnsland IH : 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.
 18. Ito H, Takekoshi T, Miyauchi M, et al. : Three-dimensional appearance of Langerhans cells in human gingival epithelium as revealed by confocal laser scanning microscopy. *Archs Oral Biol* 43:741-744, 1998.
 19. Zhang X, Ji RR, Arvidsson J, et al. : Expression of peptides, nitric oxide synthase and NPY receptor in trigeminal and nodose ganglia after nerve lesions. *Exp Brain Res* 111:393-404, 1996.
 20. Shotton DM : Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. *J Cell Sci* 94:175-206, 1989.
 21. 오순이, 김명국, 백기석 : 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후 삼차신경절에서의 Substance P 면역반응세포의 분포에 관한 공초점레이저주사현미경적 연구. *대한구강해부학회지* 22(2):113-128, 1998.

Abstract

CHANGE OF VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE(VIP) IMMUNOREACTIVE
CELLS FOLLOWING PULP EXTIRPATION IN RAT TRIGEMINAL GANGLION:
A CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPIC STUDY

Heung-Joong Kim*, Seung-Jae Kim*, Joo-Cheol Park*,
Chang-Seop Lee, Sang-Ho Lee

Dept. of Oral Biology Research Institute and Dept. of Pediatric Dentistry,
College of Dentistry, Chosun University*

The purpose of this study was to investigate the distribution and fluorescence intensity of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive(VIP-IR) cells in rat trigeminal ganglion following pulp extirpation of rat mandibular molar. The animals were divided into control group(n=6) and experimental group(n=6). The experimental animals were sacrificed at 14 days after pulp extirpation. The trigeminal ganglion was removed and immersed in the 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. Serial frozen sections about 20 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 fluoresce isothiocyanate(FITC) conjugated anti-rabbit IgG(1 : 80) as secondary antibody.

The slides were observed under confocal laser scanning microscope(CLSM). Unprocessed optical sections were obtained and stored on a optical disk. Color pictures were printed by a video copy processor.

The results were as follows:

1. The positive ratio of VIP-IR cells in mandibular part of trigeminal ganglion were 7.40% in control group and 28.42% in experimental group(14 days after pulp extirpation).
2. The relative fluorescence intensity of VIP-IR cells in mandibular part of trigeminal ganglion were 87.78 in control group and 138.65 in experimental group. The relative fluorescence intensity of experimental group was 58% higher than that of control group.
3. In optical serial section analysis of VIP-IR cells of experimental group, most of the 9 sections showed high fluorescence intensity. At high magnification, axons of the experimental group displayed greater VIP-IR than in the control group, and the positive cells were mainly of medium size.

The result indicate that number and fluorescence intensity of VIP-IR cells were increased in the mandibular part of trigeminal ganglion following pulp extirpation of mandibular molar, and it suggests that VIP could play a role in processing of nociception.

Key words : Trigeminal ganglion, Pulp extirpation, VIP, CLSM