



계태아 발생시 TGF- β 3가 구개판 내측돌기상피의 상피근엽변환 및 상피성장인자수용체 발현에 미치는 영향

양병은¹, 이종호²

관동대학교 의과대학 명지병원 구강악안면외과¹

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실²

ABSTRACT

Effects of TGF- β 3 on Epithelial-mesenchymal transformation and Epidermal growth factor receptor expression in palatogenesis of chicken embryo

Byoung-Eun Yang, D.D.S.¹, Jong-Ho Lee, D.D.S., M.S.D., Ph.D.²

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Myongji Hospital, College of Medicine, Kwandong University¹

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University²

Cleft lip and /or palate is the congenital orofacial malformation most commonly occurred in humans. The disease is multifactorial and is probably caused by genetic and/or environmental factors. So, there are many problems in research concerning etiology and in treatment of the disease.

Even the most practiced and sophisticated methods of surgical repair are necessarily followed by scar contraction and fibrosis, which result in skeletal defects, dental abnormalities, cosmetic disfigurement, and speech impairment. As a result, Fetal surgery can be considered but practiced rarely when the deformity is not fatal to life. And treatment of cleft palate is performed in the form of medicine projection into uterus in animal experiments.

Many studies show that growth factor and its receptor emerge from the developing palate; and the epidermal growth factor receptors have a important role in craniofacial development and in palatal fusion. The palatal morphogenesis of the avine is different from the mammal's; it takes the form of physiologic cleft palate. Recently, cleft palate fusion experiment was performed when the avine were in the period of palate formation through the exogenous TGF- β 3 addition, and it showed that the exogenous TGF- β 3 makes fusion of divided palate through certain process when cleft palate is occurred in palatal formation. In this study, I had the confirmation of the fusion of cleft palate through the addition of TGF- β in case of chicken embryo, and observed the effect of TGF- β in EGF receptor distribution. And the following is the results of this study.

1. In case of the TGF- β 1 and β 3 addition group, there was the decrease of EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor) immunoreactivity in mesenchymal cells beneath the medial edge epithelium and also in epithelial mesenchymal interface which is between medial edge epithelium and nasal septum in 72 hours.
2. The immunoreactivity of the control group resembles that of normal chicken embryo palate in development.
3. In the view through fluorescence confocal microscopy, there was confluence in TGF- β 3 addition group.

This shows that the confluence induced by exogenous TGF- β 3 is related to EGFR expression in palate of chicken embryo, which is a physiologic cleft palate model.

서론

구개의 형성은 두개안면발육에서 아주 중요한 과정이다. 이런 구개의 형성과정은 종(species)마다 약간씩 다른 양상으로 나타나는데 이 중 조류의 구개발생양상을 보면 양측의 구개판이 상악돌기에서 나와서 포유류에서처럼 수직으로 자라지 않고 혀의 배측 상방으로 수평으로 자라게 된다.¹⁾ 수평으로 성장한 조류의 구개판은 근접되다가 서로 만나게 되지만 내측돌기상피(MEE-Medial Edge Epithelium)가 접합(adhere)되지도 않으며 융합(fuse)되거나 없어지지 않고 각화되어 자연적인 구개열의 형태를 지니게 된다.²⁾ 이런 이유로 자연적인 구개열 모델로서 이용이 되고 있다.^{1, 3)} 현재 구개열의 모델로는 약제에 의해 유발시킨 모델⁴⁻⁷⁾과 유전적 방법에 의한 모델^{8, 9)} 태자발생시 외과적으로 유발시킨 모델¹⁰⁾ 등이 있으나 각각 연구대상으로서 장단점을 지니며 종의 수태 기간별 구개발생의 차이점을 인지해야 한다.

구개형성과정 중 다양한 성장인자와 관련 수용체가 관여하게 되는데 이 중 대표적인 성장인자로는 TGF- β 를 들 수 있다.^{4, 5, 11, 13)} TGF- β 는 배아 형성과 태자발육, 종양세포의 증식, 성체의 상처치유에서 중요한 생체내 조절기능을 지니는데 TGF- β 는 알려진 것으로 총 5개의 아류가 있는데 이 중 TGF- β 1과 TGF- β 2는 현저한 상동성을 가지며 유사한 수용기(receptor)에 결합한다.¹⁴⁾ TGF- β 3는 구개형성에 중추적인 역할을 할 뿐 아니라^{3, 8, 9)} Meckel연골, 심장의 형성(cardiac morphogenesis), 유선발생(mammary gland development) 그리고 상처치유 등에 관여한다고 보고되고 있다.¹⁵⁾

상피성장인자수용체(Epidermal growth factor receptor)는 구개형성시 관여하는 여러 수종인자 및 수종인자 수용체와 밀접한 관련을 맺고 있으며 상피성장인자수용체 신호체계가 정상적인 두개안면 발육을 포함한 구개접합(palatal closure)에 밀접하게 관여함을 보고하고 있고 실험적으로 상피성장인자수용체가 결핍된 생쥐에서 높은 율의 구개열이 발생

함을 보고하고 있다.¹⁶⁾ 또한 다이옥신(2,3,7,8,-tetrachloridibenzo-p-dioxin ; TCDD)이나 Retinoic acid가 구개열을 유발시키는 원인도 상피성장인자수용체와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.^{6, 17-19)} 연구에서²⁰⁾에서 Ectocervical epithelial cells에서 상피성장인자수용체가 TGF- β 에 의해 조절된다는 보고가 있으며 TGF- α 는 상피성장인자와 태생시 동족체(embryonic homologue)이므로 상피성장인자수용체와 반응하게 되는데 TGF- β 는 상피계통에서 세포를 죽이는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾

상 피 간 엽 변 환 (Epithelial mesenchymal transformation)은 태자발생에서 아주 중요한 현상이며 처음 상피 간엽분화는 원시선조(primitive streak)가 중배엽과 내배엽을 형성하는 간엽을 발생시킬 때 외배관(epiblast)에서 발생한다. 그 결과로 신경관(neural tube)에서 신경능(neural crest)의 형성하고 체절(somite)과 외측 중배엽에서 다른 형태의 간엽을 형성하는데 관여하게 된다. 내측돌기상피의 태자상피가 없어지게 되는 것은 계획된 세포사에 의한 것이 아니라 상피간엽변환에 의한 것이라는 보고가 있어 왔다.²¹⁻²⁵⁾ 설치류등에서 상피성장인자 수용체분포양상과 관련된 보고가 많이 있어왔고^{4, 11, 18, 26-28)} 여러 인자들에 의한 수용체의 분포변화들이 구개에 미치는 양상을 보고한 논문이 많이 있어왔으나 계태아의 구개부위에서 상피성장인자수용체의 분포와 관련된 연구는 아직까지 없었다.

이 연구는 생리적 구개열을 지닌 계태아에 외부 TGF- β 를 투여하여 구개형성에 미치는 양상을 살펴 보고 계태아 구개판 내측돌기상피서 상피성장인자수용체의 분포가 알려진 설치류의 구개형성시 수용체 분포와 비교해보고 외부의 TGF- β 투여가 상피성장인자수용체 분포 및 상피간엽변환에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 계태아구개의 준비 및 라벨링

수태된 달걀을 40°C(습기하)에서 부화한다. 계태아를 (태자 8일-9일/ Hamburger-Hamilton stage 35)에서 얻어서 HBSS(Hankes Balanced Salt Solution)에 놓는다. 라벨링을 위해 아래턱을 제거한 머리부분만을 HBSS내의 CCFSE(5-,6-carboxy 2-7-dichlorofluorescein diacetate succinimidyl ester; Molecular Probes Inc. USA) 내에서 37°C도에서 1시간 동안 위치시킨다. CCFSE는 DMSO(dimethyl sulphoxide)에서 10mM stock용액으로 두었다가 사용 전 HBSS에서 1:200 부피비로 희석해서 사용하였다. CCFSE 노출 후 머리부분을 HBSS(Hankes Balanced Salt Solution)로 깨끗하게 세척한 후 부리부분을 제거하고 구개만을 채취하였다. 이와 같이 라벨링 후 준비된 구개를 내측돌기(medial edge)가 서로 닿고 비강측이 아래쪽으로 오도록 0.5% agar젤상에 쌓으로 위치시켰으며, DMEM:F12(1:1, pH 7.4)에 3.15mg/ml glucose, 2.5 mM L-glutamine, 0.055mg/ml sodium pyruvate, 0.25mg/ml ascorbic acid 그리고 1% 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 무혈청화학배지에서 장기배양하였다. 대조군은 pH 7.4의 1:1 DMEM:F12에 3.15mg/ml glucose, 2.5 mM L-glutamine, 0.055mg/ml sodium pyruvate, 0.25mg/ml ascorbic acid 그리고 1% 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 무혈청화학배지에서 배양했다. 실험군 1군은 상술한 구성된 무혈청화학배지에 TGF-β₃(Peprotech Inc. USA)를 10ng/ml 첨가하고 실험 2군은 TGF-β₁(Peprotech Inc. USA)을 10ng/ml 첨가하였으며, 대조군은 무혈청배지만을 사용하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였다.(37°C, 5% CO₂, 95%공기습도) 상피성장인자수용체의 면역조직화학염색을 시행하기 위해 수태 후 9일, 10일, 11일째에서 계태아를 얻어 아래 턱과 혀부분을 제거하였다.

2. 공초점 레이저 현미경을 이용한 관찰.

CCFSE를 이용한 형광현미경 검사는 일반형광현미경으로 관찰시 간섭현상 및 선명도 저하를 초래하므로 공초점 레이저 현미경을 이용하였다. CCFSE에 노

출된 구개를 24에서 72시간에 걸쳐 배양 후 4% 파라포름알데하이드로 2시간 동안 고정하고 PBS에 세척 후 파라핀 처리 하였다. 7μm 두께의 박절편을 만든 다음 파라핀을 제거하고 염색하지 않은 상태에서 공초점 레이저 현미경하에서 관찰하였다. 그리고 연속된 4μm의 절편을 만들어 통법에 따라 H&E 염색을 시행하였다.

3. 상피성장인자수용체(Epidermal growth factor receptor; EGFR) 분포를 알아보기 위한 면역조직화학 염색

상피성장인자수용체에 대한 염색과정은 다음과 같다. 4μm 두께로 박절한 조직편은 Silane이 피막된 유리 슬라이드 상에 부착한 다음 통상적인 방법에 따라 탈 파라핀 처리를 하고 조직내 과산화 효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에서 10분간 처리하고, 0.01% citric buffer(pH 6.0)를 사용하여 microwave법으로 10분간 처리하고 다시 0.01M 인산완충생리식염수(PBS, pH7.4)로 각 5분씩 3회 수세하였다. 배경의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 1% bovine serum albumin으로 30분 동안 처리하였다. 일차항체로서 EGFR 다클론 항체(Sheep polyclonal IgG; Upstate Biotechnology Inc. U.S.A.)를 1:40으로 희석하여 사용하였고, 4°C에서 밤새 반응시켰다. 여기에 Rabbit Anti-Sheep IgG, HRP Conjugate (Upstate Biotechnology Inc. U.S.A)를 결합시킨후 발색은 DAB (3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride) 로 하였으며, 대조염색은 Mayer's hematoxylin 을 이용하였다.

결 과

1. 공초점 주사현미경 소견

CCFSE는 상피에만 국한되어 결합조직내로 침투가 불가능한 지질용해성의 형광 물질이다.²⁵⁾ 대조군의 경우 형광 물질(carboxyfluorescein body)이 기저세포의 기저막을 통과하지 못하고 결합조직 하방은 투

과되지 못한 상태로 보였다. 24시간 48시간 72시간에 모두 걸쳐 벌어져 있는 양상을 보였다. 그림(그림 1)은 CCFSE로 라벨후 48시간된 모습과 H&E염색전의 조직 사진을 합성한 모습이다. 노란색으로 보이는 부분이 CCFSE로 라벨된 부분(화살표)이다. 접촉 부적으로 상피간엽변환은 볼 수가 없었다.

실험군 1(TGF-β3투여군) 24시간 경과시의 소견을 보여주는 그림(그림2)은 접촉부위의 융합이 비강측으로부터 이루어지고 있는 것을 볼 수 있으며 형광물질의 소실을 볼 수가 있는데 상피융합(epithelial seam)부분이 섬유아세포의 지속적인 층으로 대체됨을 보여주고 있으나 아직 형광물질이 잔재해 있음을 보여준다.(화살표) 48시간 경과시의 그림(그림3)은 비중격이 제거되지 않은 상태로 배양이 이루어졌다.(비중격부분 화살표) 우측 구개와 비중격사이에 상피융합이 이루어져 있고 간엽변환을 통해 섬유아세포의 지속적인 층으로 대체됨을 보여주고 있다.(붉은색 화살표) 그림(3-1)은 형광물질만을 보여주는 그림이다. 흰색 화살표로 보이는 부분이 형광물질이 소실되어 섬유아세포의 지속적인 층으로 연결된 confluence를 보인다. 그림(그림 4)은 72시간 경과후의 모습이다. 우측 구개와 비중격 사이의 상피융합이 더 긴밀해져 있고 상피간엽변환이 이루어져 가는 모습을 보인다. 그림(5,6,7)은 실험군 2(TGF-β1투여군)의 24시간 48시간 72시간에 걸친 모습이다. 절편의 잘림이 정중 시상면이 아닌 관계로 멀리 떨어져 있어 보이는 듯하나 48시간(그림6)의 소견은 비강측1/3 정도의 상피융합부분이 보이기 시작한다. 그림 7은 초기 고정부적으로 인한 접촉도 이루어지지 않은 것으로 보인다.

2. 상피성장인자수용체의 면역조직화학염색소견

대조군 48시간에서 구개의 내측돌기상피부위의 비후소견이 보이고 전반적인 간엽과 상피에 걸쳐 상피성장인자수용체의 면역반응도를 보이며 상피와 인접한 부위의 간엽에서 깊은 층보다 면역반응도가 높게 나타난다.(그림8) 72시간 경과후의 모습에서도

비슷한 양상을 보인다. (그림9, 9-1) 실험군 1의 48시간 경과후의 모습에서 내측 돌기 상피부위의 면역반응도가 감소함을 보이고 있다 비중격과의 계면에서 접합은 있으나 confluence양상은 알 수 없었다. (그림10, 10-1) 실험군 1의 72시간 배양후의 모습의 내측 돌기부분에서에서 면역반응도가 48시간보다는 떨어져 있다. 비중격과 구개돌기와의 계면에서 융합소견을 보인다. 확대소견에서 퇴화되어가는 상피융합부에서 상피성장인자수용체의 면역반응도가 증가되는 소견이 보이고 섬유아세포의 연속성을 보이는 부분에서 상피성장인자수용체 면역반응도가 감소되어 보인다. 접합부분의 일부에서 상피성장인자수용체 면역반응도가 보이고 있다. (그림 11, 11-1, 11-2, 11-3) 실험군 2의 72시간배양후의 모습에서 정량적 실험군 1과의 정량적 비교는 알 수 없으나 1군의 72시간 소견과 같이 내측돌기부분의 간엽에서 상피성장인자수용체 면역반응도의 감소소견이 보이지만 융합소견은 보이지 않았다. (그림 12, 12-1)

계태아 발생 9일째의 구개부위 상피성장인자수용체 발현 소견에서는 구개부위가 멀리 떨어져 있고 상피부위에서 상피성장인자수용체소견이 강하게 나타나며 상피부위보다 미약하나 간엽부위에서도 고르게 상피성장인자수용체소견을 보인다. (그림 13, 13-1, 13-2) 발생 10일째 소견에서는 9일째보다는 구개 선반이 내측으로 이동한 양상을 보이며 여러 겹의 주름진 소견이 보이고 역시 9일째와 비슷한 상피성장인자수용체발현 소견을 보인다. (그림 14, 14-1, 14-2) 발생 11일째 소견에서도 10일째에 비해 더 내측으로 구개관이 이동된 양상을 보이나 상피성장인자수용체소견의 별다른 차이를 보이지는 않았다. (그림 15, 15-1, 15-2)

충돌 및 고찰

여러 연구에서 발생 중 구개에서 성장인자나 수용체가 나타남을 밝히고 있다. 2, 11, 15, 16, 22, 30) 이런 성장인자 중에 TGF-β3는 이차구개열의 융합에 반드시 필

요한 것으로 밝혀졌으나^{8,9)} 닭 등의 조류에서는 선천적으로 TGF- β 3가 구개부위에 존재하지 않고 부리 (beak)부분이 기계적 방해물로 작용하는 역할을 하여 선천적 구개열의 형태를 보이는 것으로 보고되고 있다.³⁾ 구개발생 중 상피성장인자수용체의 분포에 대해 설치류에서 여러 연구들이 있어 왔다. 본 연구는 조류의 구개(선천적, 생리적 구개열)의 상피성장인자수용체 분포의 양상을 살펴보고 보고된 설치류에서의 분포와 비교해 보고 조류태자 발생중의 구개에서 거의 존재치 않는 TGF- β 3가 상피성장인자수용체 발현에 미치는 영향과 TGF- β 1이 미치는 효과를 규명해보자 조류의 구개모델에서 상피성장인자수용체와 TGF- β 3와의 관계를 알아보았다.

구개발생의 양상은 종(species)마다 다른데 상악돌기에서 양측의 구개관이 나오는 시기가 생쥐의 경우는 태생 12일, 닭은 태생 6일, 악어류는 태생 17일, 사람은 태생 45일이다. 이런 종의 구개 발생 시작 및 완료단계는 구개열과 관련된 연구에서 중요한 지표가 된다. 구개열은 태자발생과정 중 어느 단계에서도 발생할 수 있는데 부분별 원인을 보면 구개관 성장의 결손, 구개관상승의 실패, 구개관융합(fusion) 결손, 내측돌기세포사의 실패, 융합 후 파열(rupture), 간엽변환과 강화(consolidation)의 실패 등이다.²⁾ 이런 다양한 원인에 의한 발생으로 인해 그 연구에 어려운 점들이 많으나 본 연구에서는 TGF- β 3결핍에 따른 선천적인 구개열의 표현형을 보이는 계태아를 이용하였다.

발생과정중의 여러 수중성 성장인자에 대한 연구들이 활발히 진행되어 왔는데 이 가운데 상피성장인자는 간엽이 존재하고 있을 때에 구개 내측상피세포사를 억제하고 상피세포분화와 증식 그리고 각화를 자극하며⁵⁾ 제V형 콜라겐과 하이알루론산을 합성하는 것으로 알려져 있고^{30,31)} TGF- α 는 상피성장인자의 태생 중 상동체로 여겨지며¹¹⁾ TGF- β 는 epithelial lineage에서 세포를 죽이는 것으로 알려져 있고 생쥐의 발생 중 구개부위에서 분포되고 있는 것으로 보고된다.²⁾ 하이알루론산은 포유류에서 구개관의 상승기

전과 관련이 있는 물질로 여겨지는데 이러한 구개관의 수직상승이 관찰되지 않는 조류의 경우에는 어떤 양상으로 나타날지 추적조사가 필요할 것으로 생각되어진다.¹¹⁾

발생 중 구개에서 이러한 성장인자의 변화는 다음 두 가지에 의해 생기는 것으로 추정되는데 첫째로는 특정부위에서 접촉되는 단백질이나 세포외기질 분자에 성장인자가 붙거나 sequestration되거나 아니면 양수내에 존재하다가 비구강을 통해서 구개조직내로 국소적으로 주입되는 경우이다. 성장인자의 증감은 반응하는 세포상의 수용체의 증감과 관련이 있다. 다른 성장인자들이 서로 상호작용을 하며 증강된 혹은 반대의 효과를 나타내기도 하며 서로 복잡한 층을 이루어 작용하게 된다. TGF- β s는 최소한 5가지의 구별된 형태를 지닌 다기능성분자로서 포유류의 경우는 세가지형태(β 1, β 2, β 3)가 확인되고 있다.⁵⁾ 이중 TGF- β 1과 β 2는 상동성이 있으며 유사한 수용체에 결합한다. TGF- β 자체는 배아 형성과 태자발육, 종양 세포 증식 등에서 중요한 조절기능을 갖는 것으로 밝혀졌다.¹⁴⁾ 연구에서 TGF- β 3가 in vitro에서 계태아 구개내측돌기상피를 간엽으로 변환시키는 것을 촉진한다고 밝혔다.³⁾ 이 연구는 여러 용어 - 부착(adherence), 융합(fusion), 합류(confluence) - 를 나열하고 있는데 부리를 제거한 쌍의 구개 배양에서 융합(fusion)은 모든 군 (TGF- β 1,2,3로 처리한 군)에서 이루어졌고 이 융합(fusion)에 대해 두 가지의 구별된 양상을 언급하고 있는데 adherence와 confluence이다. adherence는 midline epithelial seam을 말하는데 contact시 반대편의 내측돌기상피 기저층사이에 true desmosome이 형성되는 것이고 confluence는 이러한 seam이 섬유아세포의 지속된 층과 세포외기질로 대체되는 것이다. 여기서 TGF- β 1, 2와 TGF- β 3의 차이가 있는데 모든 군에서 adherence의 단계가 보이지만 confluence는 TGF- β 3 처리군에서만 보였다.³⁾ 계태아 구개에서 TGF- β 의 면역조직화학염색법을 통해 살펴보면 생체에서 구개융합기간 동안 TGF- β 1을 보이고 TGF- β 2와 β 3는 없다고 보고했다.

또한 실험실배양에서 계태아의 내측돌기상피상에 TGF-β3 발현이 안 나타난다고 보고했다.

상피성장인자는 다양한 조직의 성장을 자극하고 따라서 상피성장인자수용체의 발현은 태아조직에서 기관형성시 중요한 역할을 할 것으로 예상되며^{29, 32)} 정상적인 두개안면발달 및 구개의 융합에 중요한 역할을 한다.¹⁶⁾ TGF-α와 상피성장인자는 상동관계를 지니므로 상피성장인자수용체를 통해서 설치류와, 양 그리고 닭 등에서 작용을 나타낸다.¹¹⁾ Retinoic acids(이하 RA)^{6, 13, 18, 28)}나 TCDD(다이옥신)²⁷⁾가 구개 발생시기에 상피성장인자수용체의 위치에 영향을 주어 설치류에서 구개열을 발생시키는 것으로 알려져 있다. 그 기전을 보면 구개의 내측돌기상피에서 정상적인 상피성장인자수용체의 감소를 방해하거나 오히려 노출 후 더 증가시키는 양상을 나타내는 것이다. 이런 양상은 정상적인 계태아의 구개발생 과정에서 구개발생시기에 상피성장인자수용체가 변화없이 지속적으로 발현시키는 것과 같은 양상을 보이는 것으로 추정된다. 상피성장인자수용체는 보통 생쥐의 경우 태생 12일에 구개에서 나타나게 된다는 보고¹⁸⁾와 13일에 나타난다는 보고가 있는데³³⁾ 본 연구에서는 구개발생단계를 기준으로 보았을 때 비슷한 시기인 태생 9일째의 계태아에서 상피성장인자수용체를 발견할 수 있었는데 그 전의 발견여부도 조사가 필요할 것으로 여겨진다. Dixon 등의 연구에서 설치류의 구개에서 TGF-α는 태생 12일에 구개간엽에 전반적으로 나타나나 상피부위에서는 발견되지 않고 태생 13일에 구개첨단의 간엽부위와 구개상피에서 점차로 증가하며 구개판이 융합(fusion)되는 시기인 태생 14.5일에 중심상피융합부위와 인접 간엽부위에서 강하게 나타난다. 태생 15일째에 구개상피부위에서 전반적인 증가를 보이며 퇴화된 상피융합부

위에서 뚜렷하게 보인다. 상피성장인자수용체의 경우는 중심상피융합의 퇴화시기에 구개의 내측돌기상피에서 강하게 나타나는 것으로 보고하고 있다.

상피성장인자수용체가 결핍된 생쥐(EGFR-/-)는 좁고 긴 형태의 주둥이와 발육 부진한 아래턱, 높은 율의 구개열 양상을 보이는 표현형으로 나타난다.¹⁶⁾

Miettinen 등은 (EGFR+/+)과 (EGFR+/-)의 경우 태중 14.5일에 생쥐에서 구개판이 수평위치가 되면 무혈청 조건(serum-free condition)하에서 이것을 얻어 4일간 배양했을 때 상피간엽변환을 통해 세포이주, apoptosis를 이루어 생체에서처럼 내측돌기상피가 사라지고 결국 간엽의 연속성(mesenchymal continuity)을 이루게 되었지만, (EGFR-/-)의 경우는 이와 달리 잔존내측돌기상피(residual medial edge epithelium)가 높은 율로 남아 있었다라고 보고했다. 또한 상피성장인자수용체는 정상적으로 퇴화된 내측돌기상피에서 발현되므로 상피성장인자수용체매개 신호는 접합파열(seam disruption)과 관여되는 것으로 여겨진다고 보고했다. 본 연구에서도 TGF-β3에 의해 confluence를 이룬 계태아의 구개에서 퇴화된 내측돌기상피부위에서 상피성장인자수용체의 발현양상을 볼 수 있었다. 다이옥신(TCDD) 역시 구개열 유발하는데 이러한 내측돌기상피에서의 상피성장인자수용체 발현의 정상적 down regulation을 방해하여 세포가 계속해서 증식하게 하고 apoptosis가 생기지 않도록 하는 결과를 초래하게 한다.¹⁹⁾ 이 연구¹⁶⁾에서 상피성장인자수용체가 두개안면발달을 조절하는 기전을 찾고자 했는데 세포의 matrix metalloproteinase(MMPs)가 하악 형성을 조절하고 구개의 융합시기동안 내측돌기의 퇴화를 위해 기저막제거(basement membrane removal)가 필수적이라고 했고 MMPs기능의 억제가 상피성장인자수용체 활

표 1. Antibody Used

primary Ab raised against	primary Ab raised in	Supplier	secondary Ab	secondary Ab raised in	Dilution	Supplier
EGFR (Chicken Embryo)	Sheep anti-EGFR	UB Inc.	Anti-sheep IgG (HRP conjugate)	Rabbit	1:200	UB Inc.

동의 억제와 비슷한 표현형을 보이는 것으로 나타났다. 이 연구는 MMPs가 두개안면발달에서 상피성장인자수용체 신호체계의 key mediator임을 보였다.

Autoradiograph study에서 태중 13일(생쥐에서)에 구개상피에서 상피성장인자수용체 결합부위의 존재를 밝혔다.²⁹⁾ RA가 구개형성기간 동안 상피성장인자수용체발현에 영향을 주는 것에 대해 자세히 살펴보면 생체내에서 기관배양시(실험실상에서) 대조군의 구개의 내측돌기상피는 인접된 구강측이나 비강측의 상피와 달리 상피성장인자수용체의 점진적 감소를 보인다. 이 기간에 내측세포는 DNA 합성을 멈추고 계획된 세포사를 하게 되는데, RA에 노출된 내측상피세포는 상피성장인자수용체를 계속 발현하게 되고 상피성장인자와 결합하여 증식하게 되고 계획된 세포사가 되는걸 방해하여 비강측세포의 전형적 형태를 나타낸다. RA는 세포배양모형에서 상피성장인자의 결합을 강화시키고 상피성장인자수용체 수를 증가시킨다고 보고했다.¹⁸⁾

연구에서²⁹⁾ 생쥐 태자 내 조직에서의 상피성장인자수용체 발현의 temporal sequence에 대해 보고하고 있으며 상피성장인자가 발생시기에 따라 다르게 기능할 수 있다는 가설을 세웠다. 그래서 태자 세포에서는 초기에 증식을 자극하고 성체의 조직에서는 분화를 야기한다고 했으며, 면역조직화학연구를 통해 상피성장인자수용체 면역반응도는 태중 12, 13, 14의 발육 중 생쥐태자의 구개에서 발견되는데 구개의 상피와 간엽에서 regional heterogeneity와 temporal sequence를 보인다고 했으며 상대적으로 상피성장인자수용체 염색은 구강 측 상피와 내측돌기상피에서 약하게 나타난다고 했다. 구개융합(palatal closure)후 상피성장인자수용체 면역반응도는 비강측의 상피보다 구강 측의 상피에서 더 강하게 나타난다고 보고했다. 구개판이 접촉(contact)할 때 융합된 구개(fusing palate)의 내측끝에서 상피성장인자수용체의 면역반응도가 소실됨을 발견할 수 있는데 이것은 내측상피 접촉(medial epithelial contact)부위

에 내측끝(medial tip)의 세포가 구개융합에 필수적일 수 있는 특이적인 세포접합분자(specific cell adhesion molecules)나 desmosome으로 발달됨을 보여준다. TGF- α 와 상피성장인자는 태생 중에 상등관계를 지녀 상피성장인자수용체와의 연관성에 관해 연구한 보고는 수 차례 있어왔으나^{11, 20, 34-37)} 연구에서 Ectocervical epithelial cells에서 TGF- β 가 상피성장인자수용체를 조절하고 있다고 보고했다. 이 논문에서는 주로 TGF- β 1에 대한 내용을 다루고 있는데 그 기전을 보면 내부 또는 표면의 상피성장인자수용체는 thereonine 654상의 protein kinase C에 의해 phosphorylation되어 kinase activity를 잃게 된다. 이 연구에서는 human ectocervical epithelial ECE16-1 cells(Human papillomavirus-16 immortalized ectocervical epithelial cells)에서 TGF- β 에 의해 상피성장인자수용체가 조절됨을 보이고 있다. 지속된 ECE16-1 cells에 대한 TGF- β 처리는 apoptosis 비슷한 계획된 세포사를 유발한다. 이 연구에서 세포주기에서나 p53 level에서 정량적으로 어느 정도 변화를 일으키는지는 명확하지 않으나 TGF- β 에 의한 상피성장인자수용체의 친화도가 결국 ECE16-cell death를 유도하는 결과를 가져왔음을 보였다.

생리적 구개열 모델인 계태아에서 구개형성시기에 전반적인 간엽과 상피부위의 지속적인 상피성장인자수용체의 발현이 관찰되었다. 외부에서 투여된 TGF- β 3에 의해 상피성장인자수용체의 발현소실이 관찰되는데 이것은 보고된 설치류에서의 구개형성시기별의 상피성장인자수용체 발현과 유사한 상황으로 나타났다. RA나 TCDD에 의해 유도된 생쥐에서의 구개열은 상피성장인자수용체의 소실시기에 지속적인 발현을 야기함으로써 발생하는 것으로 여겨지는데 TGF- β 3나 β 1에 의한 구조가 가능할 것으로 여겨지며 TGF- β 1에 의한 confluence는 확인할 수 없었으므로 상피성장인자수용체의 활성화도와 친화도 측면에서 TGF- β 3 투여시와의 비교연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

선천적, 자연적 구개열의 표현형을 나타내는 정상 발육중의 계태아에서 구개관부위의 상피성장인자수용체의 분포와 실험실상의 분리해 내어 배양된 계태아 구개관에서의 수용체의 비교를 시행하였다. 또한 외부에서 투여된 TGF-β가 구개선반의 상피간엽변화에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다. 태생 9일, 10일, 11일째에서 계태아의 구개관을 얻어 면역조직화학 염색을 시행하였고 실험은 대조군은 무혈청화학배지에서만 배양을 시행하였고 실험 1군은 TGF-β3 10ng/ml를 무혈청화학배지에 첨가하였고 실험2군은 TGF-β1 10ng/ml를 투여하였다. 각각의 군에서 공초점레이저현미경소견과 상피세포성장인자수용체에 대한 면역조직화학염색검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험 1군과 2군에서 72시간 경과 후 내측상피세포하방의 간엽조직에서 상피성장인자수용체의 면역활성도가 감소함을 보였으며 내측돌기상피와 비중격간의 상피간엽경계부위에서도 같은 소견을 보였다.
2. 대조군에서 면역활성도는 발육중인 정상계태아의 활성도와 비슷한 양상을 보였다.
3. 공초점형광현미경 소견에서 실험1군(TGF-β3투여군)에서 시간에 따른 정도를 결정하긴 어렵으나 confluence를 보였다.

이것은 외부에서 투여된 TGF-β3에 의한 confluence가 생리적 구개열모델인 계태아의 구개에서 상피성장인자수용체의 발현과 관련이 있음을 보여주는 것이다.

참고문헌

1. Shah RM, Crawford BJ. Development of the secondary palate in chick embryo: a light and electron microscopic and histochemical study. Invest Cell Path. 1986;3: 319-328.
2. Ferguson MW. Palate development.

Development, 103 Suppl : 41-60, 1988

3. Sun D, Vanderburg CR, Odierna GS, Hay ED. TGFβ3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. Development. 1998;125: 95-105.
4. Jaskoll T, Choy HA, Chen H, Melnick M. Developmental expression and CORT-regulation of TGF-beta and EGF receptor mRNA during mouse palatal morphogenesis: correlation between CORT-induced cleft palate and TGF-beta 2 mRNA expression. Teratology. 1996;54:34-44.
5. Degitz SJ, Morris D, Foley GL, Francis BM. Role of TGF-β in RA-Induced Cleft Palate in CD-1 Mice. Teratology. 1998;58:197-204.
6. Abbott BD, Harris MW, Birnbaum LS. Etiology of retinoic acid-induced cleft palate varies with the embryonic stage. Teratology 40 : 533-553, 1989
7. Mills JL. Folate and Oral Clefts: Where do we go From Here? New Direction in Oral Clefts Research. Teratology. 1999;60:251-252.
8. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-β3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. Nat Genet. 1995;11:415-421.
9. Taya Y, O'Kane S, Ferguson MW. Pathogenesis of cleft palate in TGF-β3 knockout mice. Development 126 : 3869-3879, 1999
10. Canady JW, Landas SK, Morris H, Thompson SA. In utero cleft palate repair in the ovine model. Cleft Palate Craniofac J 31(1) : 37-44, 1994
11. Dixon MJ, Garner J, Ferguson MW. Immunolocalization of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and transforming growth factor alpha (TGF alpha) during murine

- palatogenesis in vivo and in vitro. *Anat Embryol* 1991;184:83-91.
12. Bodo M, Baroni T, Carinci F, Becchetti E, Bellucci C, Pezzetti F, Conte C, Evangelisti R, Carinci P. TGFbeta isoforms and decorin gene expression are modified in fibroblasts obtained from non-syndromic cleft lip and palate subjects. *Dent Res*. 1999;78(12):1783-1790.
 13. Nugent P, Ma L, Greene RM. Differential Expression and Biological Activity of Retinoic Acid-Induced TGFβ Isoforms in Embryonic Palate Mesenchymal Cells. *J Cell Physiol*. 1998;177:36-46.
 14. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor beta : Recent progress and new challenges. *J Cell Biol*. 1992;119:1017-1021.
 15. Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. Transforming growth factor-β3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 1995;11:409-414.
 16. Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, Slavkin HC, Shuler CF, Derynck R, Werb Z. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nat Genet* 1999;22:69-73.
 17. Abbott BD, Birnbaum LS. Retinoic acid-induced alterations in the expression of growth factors in embryonic mouse palatal shelves. *Teratology* 1990;42:597-610.
 18. Abbott BD, Adamson ED, Pratt RM. Retinoic acid alters EGF receptor expression during palatogenesis. *Development*. 1988;102:853-867.
 19. Abbott BD, Harris MW, Birnbaum LS, Birnbaum. Comparisons of the effects of TCDD and hydrocortisone on growth factor expression provide insight into their interaction in the embryonic mouse palate. *Teratology*. 1992;45:35-53.
 20. Jacobberger JW, Sizemore N, Gorodeski G, Rorke EA. Transforming growth factor beta regulation of epidermal growth factor receptor in ectocervical epithelial cells. *Exp Cell Res*. 1995;220:390-396.
 21. Fitchett JE, Hay ED. Hay. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol*. 1989;131:455-474.
 22. Shuler CF. Programmed cell death and cell transformation in craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(3):202-217.
 23. Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, Shuler CF. Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev Dyn*. 1997;209:255-260.
 24. Shuler CF, Halpern DE, Guo Y, Sank AC. Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation in vivo. *Dev Biol*. 1992;154:318-330.
 25. Griffith CM, Hay ED. Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development*. 1992;116:1087-1099.
 26. Weller A, Meek J, Adamson ED. Preparation and properties of monoclonal and polyclonal antibodies to mouse epidermal growth factor (EGF) receptors: evidence for cryptic EGF receptors in embryonal carcinoma cells. *Development*. 1987;100:351-363.
 27. Abbott BD, Birnbaum LS. Effects of TCDD on

- embryonic ureteric epithelial EGF receptor expression and cell proliferation, *Teratology*, 1990;41: 71-84.
28. Abbott BD, Pratt RM, EGF receptor expression in the developing tooth is altered by exogenous retinoic acid and EGF, *Dev Biol*, 1988;128:300-304.
29. Shiota K, Fujita S, Akiyama T, Mori C. Expression of the epidermal growth factor receptor in developing fetal mouse palates: an immunohistochemical study. *Am J Anat*, 1990;188:401-408.
30. Silver MH, Murray JC, Pratt RM. Epidermal growth factor stimulates type-V collagen synthesis in cultured murine palatal shelves. *Differentiation*, 1984;27:490-524.
31. Turley EA, Hollenberg MD, Pratt RM. Effect of epidermal growth factor/urogastrone on glycosaminoglycan synthesis and accumulation in vitro in the developing mouse palate. *Differentiation*, 1985;28:179-285.
32. Adamson ED, Meek J. The ontogeny of epidermal growth factor receptors during mouse development, *Dev Biol*, 1984;103:62-70.
33. Nexø E, Hollenberg MD, Figueroa A, Pratt RM. Detection of epidermal growth factor-urogastrone and its receptor during fetal mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980;77:2782-2785.
34. Diaz-Ruiz C, Perez-Tomas R, Cullere X, Domingo J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor-receptor in the mesonephros and metanephros of the chicken. *Cell Tissue Res*, 1993;271:3-8.
35. Ouyang X, Gulliford T, Huang G, Epstein RJ. Transforming growth factor-alpha short-circuits downregulation of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Physiol*, 1999;179:52-57.
36. Dealy CN, Scranton V, Cheng HC. Roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor in chick limb development. *Dev Biol*, 1998;202:43-55.
37. Stromblad S, Andersson G. The coupling between transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor during rat liver regeneration. *Exp Cell Res*, 1993;204:321-328.

저자 연락처

서울시 종로구 연건동 28번지 서울대학교 치과대학 구강악안면외과 이종호 우편번호) 110-744
전화: 02-760-2630 Fax: 02-766-4948 E-mail: leejongh@plaza.snu.ac.kr

Explanation of Figures

Confocal laser scanning microscopic view

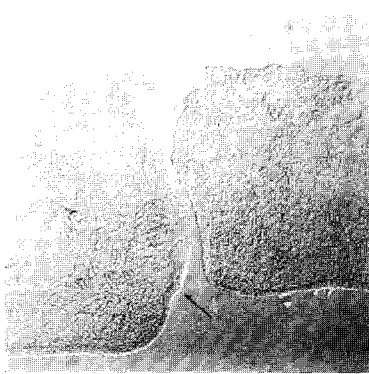


Fig. 1. 48 hours Control

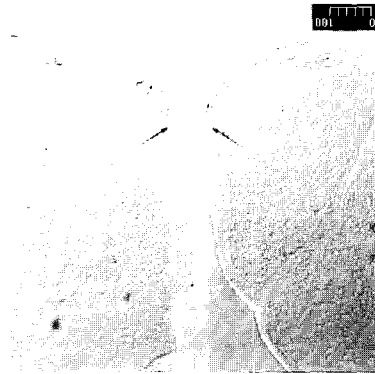


Fig. 2. 24 hours Experiment I (TGF-β3 addition group)

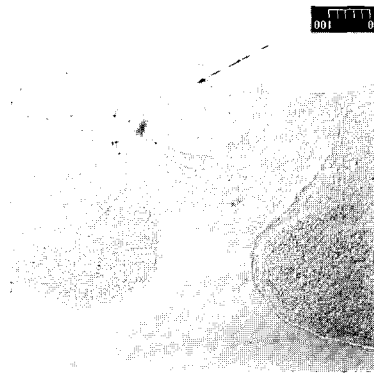


Fig. 3. 48 hours Experiment I (TGF-β3 addition group)

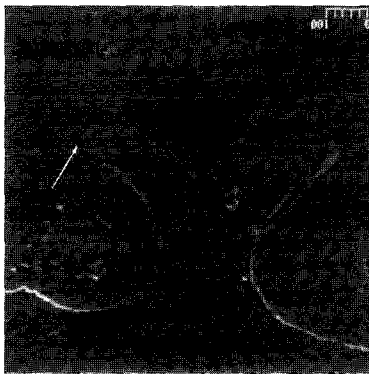


Fig. 3-1. only CCFSE view of Fig. 3.

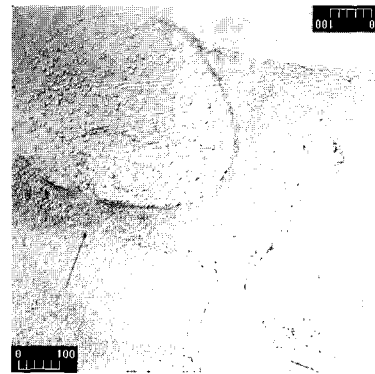


Fig. 4. 72 hours Experiment I (TGF-β3 addition group)



Fig. 5. 24 hours experiment II (TGF-β1 addition group)

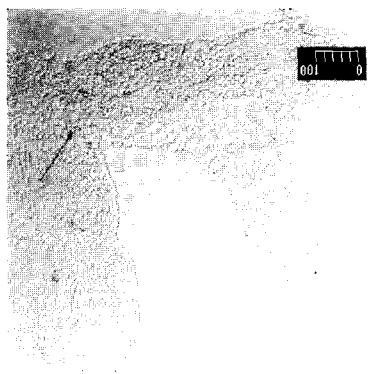


Fig. 6. 48 hours experiment II (TGF-β1 addition group)

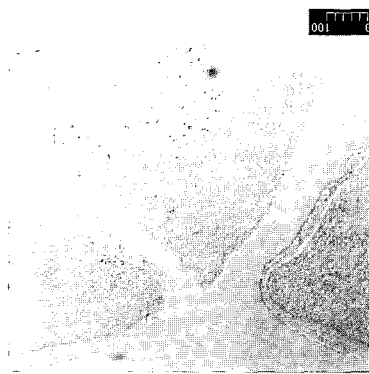


Fig. 7. 72 hours experiment II (TGF-β1 addition group)

Immunohistochemical stain of Epidermal growth factor receptor

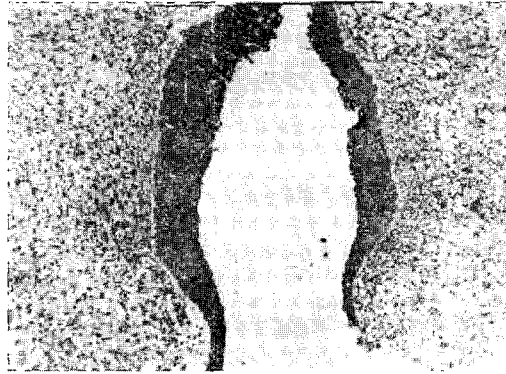


Fig. 8. 48 hours Control (X200)

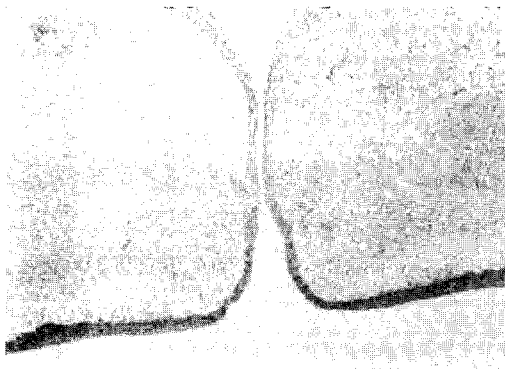


Fig. 9. 72 hours Control (X100)

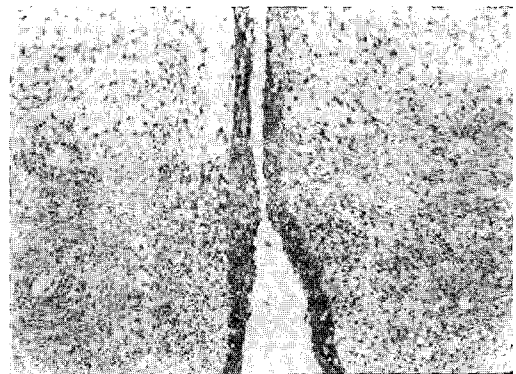


Fig. 9-1, Fig. 9. (X200)

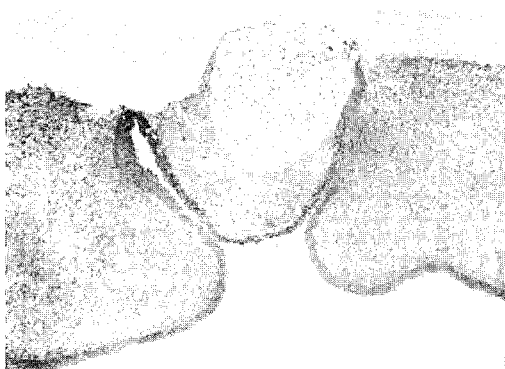


Fig. 10. 48 hours Experiment I (TGF- β 3 addition group) (X25)

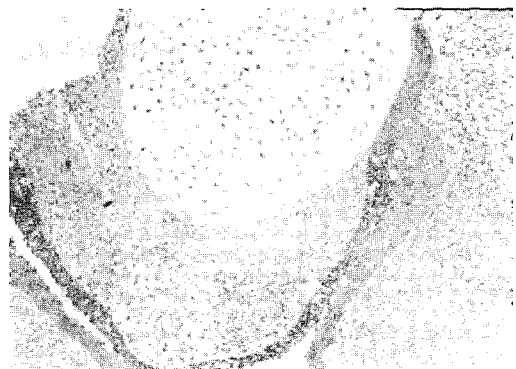


Fig. 10-1, Fig. 10. (X100)



Fig. 11. 72 hours Experiment I (TGF- β 3 addition group) (X25)

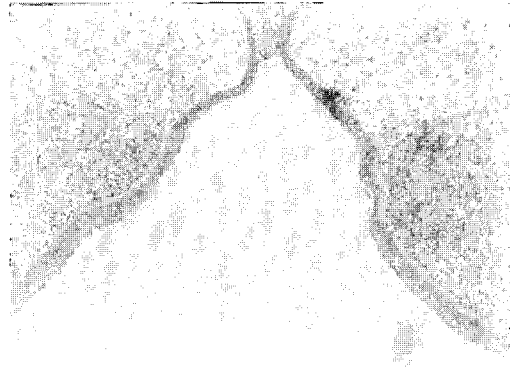


Fig. 11-1. Fig. 11. (X100)



Fig. 11-2. Fig. 11. Palatal shelf- nasal septum interface (X200)

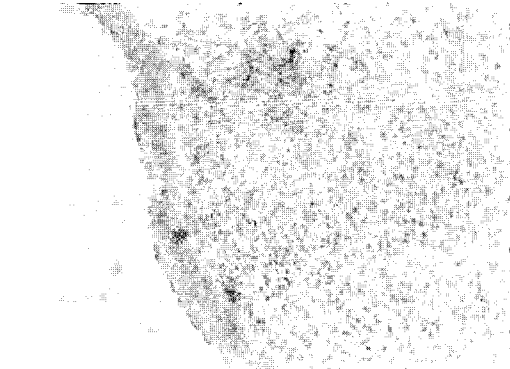


Fig. 11-3. Fig. 11. MEE (X200)



Fig. 12. 72 hours Experiment II (TGF- β 1 addition group) (X100)



Fig. 12-1. Fig. 12. (X25)

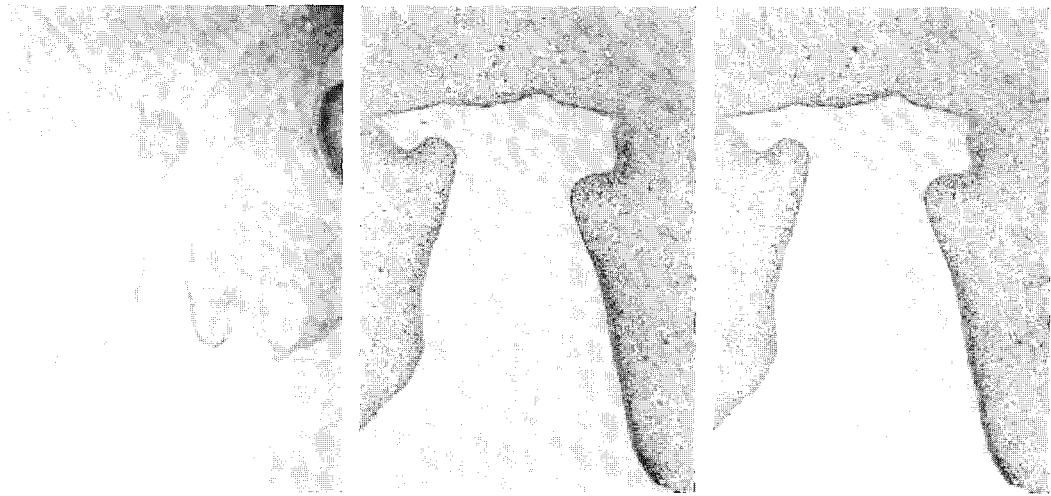


Fig. 13, 13-1, 13-2 ED 9 chicken embryo palate (X25, X100, X200)

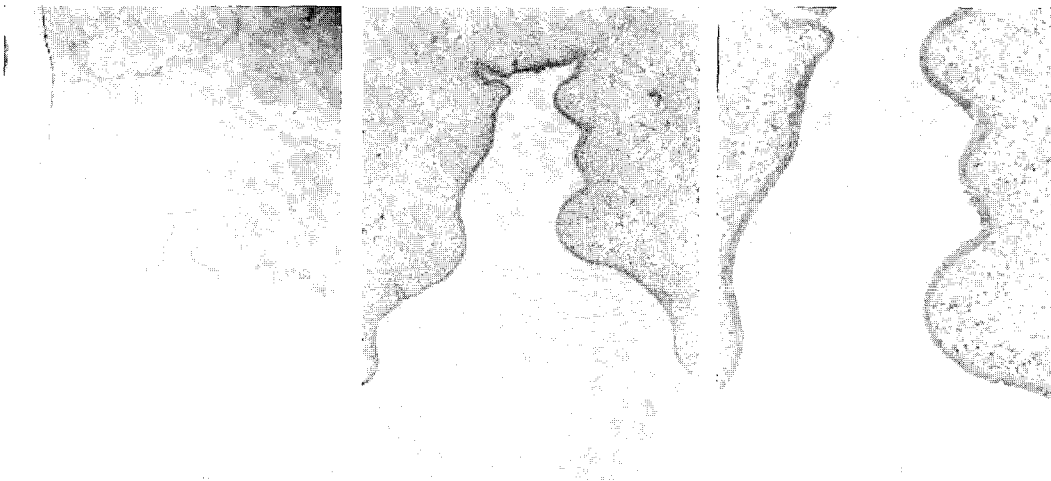


Fig. 14, 14-1, 14-2 ED 10 chicken embryo palate (X25, X100, X200)

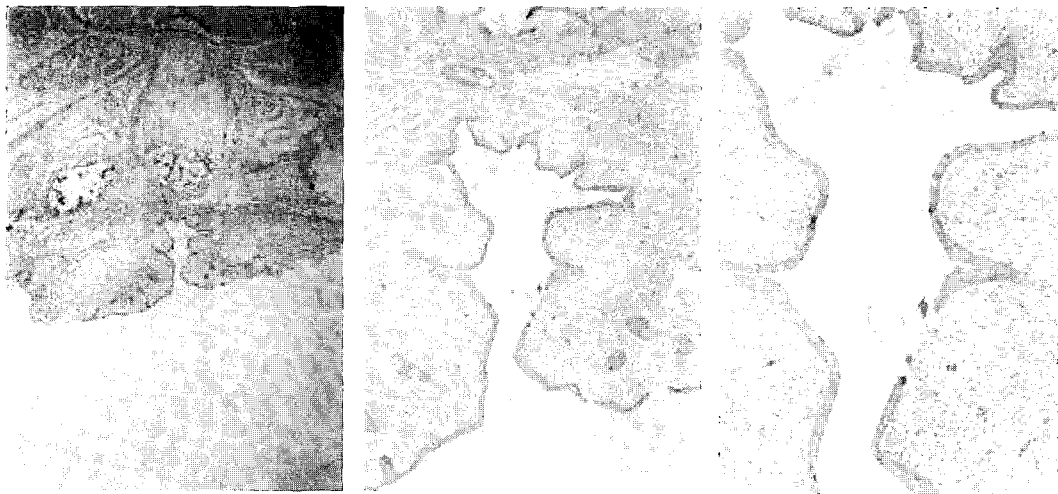


Fig. 15, 15-1, 15-2 ED 11 chicken embryo palate (X25, X100, X200)