

TGF- β 발현이 BAPN으로 유도된 구개열 백서의 구개 형성에 미치는 영향에 대한 실험적 연구

태기출 · 이동근* · 김정기**

원광대학교 치과대학 교정학교실, 구강악안면외과학교실, 원광치의학 연구소*,
전북대학교 치과대학 교정학교실**

Abstract

A STUDY OF TGF- β EXPRESSION DURING PALATOGENESIS IN RATS WITH CLEFT PALATE INDUCED BY BAPN

Ki-Chul Tae, Dong-Kun Lee, Jeng-Ghee Kim

Dept. of Orthodontics and Dept. Oral & Maxillofacial Surgery,

WonKwang Dental Research Institute, College of Dentistry, WonKwang University

Dept. of Orthodontics, College of Dentistry, Chonbuk University

Cleft palate is one of the most serious congenital anomalies in human that causes a sucking problem in newborn babies and morphologic deformity that usually leads to death in newborn mouse offspring due to an insufficient ability to suck milk. Therefore cleft palate had been researched with epidemiologic and molecular methods, and many etiologic factors were examined closely. Among of the research methods, biologic molecule researches have been more important method for cleft palate formation study. The TGF- β had an important role in the cell migration, epithelial-mesenchymal transdifferentiation, extracellular matrix synthesis and deposition. But there was a little research which was study about correlation cleft palate induced by beta-aminonitropropionitrile(BAPN) with TGF- β expression. A purpose of this presented study was examined how TGF- β expression in cleft palate mice. At gestation days 13, BAPN-monofumarate salts($(C_3H_6N_2)_2 \cdot C_4H_4O_4$, Sigma Co.) was single oral administered to 4 pregnant rats according to 1g/kg body weight. And pregnant rats were sacrificed on day 20 post coitus(p.c.). The TGF- β expression patterns of cleft formed fetus mice was followed that:

1. Osteoblast, mesenchymal cell and epithelial cell of cleft mice were low expression compare to control mice.
2. There was no TGF- β difference expression pattern of osteocyte of cleft mice compare to control mice.
3. In western blot analysis, thickness of band of TGF- β in cleft mice was thin and dilute compare to control mice.

Key words : Cleft palate, BAPN, TGF- β

I. 서 론

대략 신생아의 1,000명당 15명의 발생율을 갖는 두개안 모기형은 여러 형태로 발생하며, 선천적 기형의 8~10% 가

량이 기형유발 약물 섭취에 의한다¹⁾. 그 중 구개순이나 구개열이 동반하는 경우는 65%로 많이 발병하는 질환의 하나이다^{2,3)}. 일반적으로 사람에서 구개열이 발생하는 시기는 임신 4주나 10주사이 어떤 원인에 의해 발생되는데, 원인으

* 본 논문은 2000년도 원광대학교 교내연구비 지원을 받아 이루어졌음.

로는 나쁜 환경, 모체 질환, 화학 요법, 알코올 중독, 과도한 비타민 A의 섭취, 항응고제의 섭취, 유전적 감수성등이 보고되지만 정확한 원인과 발병 역학은 알 수 없다⁴⁾. 이런 구개열은 종종 구개순을 동반하며, 발생형태에 따라 단순 치조열과 편측성 구개열, 양측성 구개열, 점막하 파열 등으로 구분된다⁵⁾. 출생당시 수유와 심미적 목적으로 구개열 환자는 수술을 시행하게 되는데, 이 때 형성된 반흔 조직이 상하악 성장발육에 영향을 주게되어 교정학적 문제를 일으키고, 특히 구개열이 기형유발물질에 노출되거나 유전적 요인으로 인한 것일 경우 임상적으로 치료 예후가 좋지 않게 된다^{6,7)}.

구개열을 일으키는 약물로 여러 가지가 보고되는데, 실험적으로 corticosteroid나 cyclophosphamide를 이용하여 구개열을 발생시킨 연구가 있으며^{8,9)}, 초기동물실험에서는 beta-aminopropionitrile(BAPN)을 사용하여 구개열을 일으키기도 하였다¹⁰⁾. BAPN은 콜라겐의 교차결합을 억제하는 기전을 갖는 약물로 알려져 있으나 정확한 기전은 알려져 있지 않다¹⁰⁾.

포유류의 구개형성과정은 융합(fusion)과 병합(merging)과정을 동반하게 되는데, 여기에는 세포 분열과 이주, 분화, 세포의 기질 생성, 재형성, 상피-간엽 상호관계, 세포의 자가죽음(apoptosis)같은 복잡한 과정이 동반된다^{5,11)}. 융합이란 구개상피와 구개간엽세포의 이주과정으로 상악의 양돌기의 상피가 만나게 된 후 간엽세포가 서로 교통하는 과정이고, 병합이란 융합이 이루어진 후 양돌기의 간엽세포가 분열하여 증식하고 전하방 성장을 하는 과정이다. 이러한 과정에는 호르몬과 유사한 다당류 성장요소(growth factor)의 조절을 받게 된다¹²⁻¹⁴⁾.

1978년 DeLarco와 Todaro는 섬유아세포를 배양하면서 역전사바이러스에 의해 변형된 phenotype다당류를 발견하고 이것을 transforming growth factor(TGF)라고 명명했다¹⁵⁾. TGF는 TGF- α 와 - β 로 나뉘는데, TGF- β 는 situ

hydridasation 연구에서 신생아골과 거대세포에 풍부하게 존재하는 것으로 보고되고, 면역조직화학염색으로 결체조직, 연골, 골과 신경능 간엽에서 분화된 조직에 밀접하게 관련되는 것으로 보이며¹⁶⁾, 세포이주, 상피-간엽 변형 분화, 세포의 기질의 합성과 축적에 관여 및 구개발생(palatogenesis)에 밀접한 영향을 주는 것으로 보고된다¹⁷⁻¹⁹⁾.

많은 연구가 구개열 발생 및 역학에 초점을 두고 진행되는 데, 기형유발물질에 의해 발생된 구개열과 구개발생에 한 영향을 줄수 있는 TGF- β 의 발현이 어떤 관계를 보이는지는 보고되지 않았다. 이에 본 연구는 BAPN이라는 약물을 투여하여 발생된 구개열 백서에서 TGF- β 발현 양상을 면역조직화학염색 및 Western blot분석을 통해 알아보려고 시도되었다.

II. 재료 및 방법

다물 동물사육 연구소로부터 4마리의 임신 10일째 Sprague-Dawley계 백서를 구입하여 플라스틱 케이지에 톱밥과 고형 사료, 물을 공급하였다. 그 후 임신 백서를 1마리는 대조군으로, 3마리는 실험군으로 분류한 후 임신 13일째 beta-aminopropionitrile monofumarate salts (BAPN, (C₃H₆N₂)₂ · (C₄H₄O₄, Sigma Co.)를 1g/kg 체중 비율로 구강 투여하였다. 그 후 임신 20일째 임신 백서를 희생한 후 백서태자를 추출한 후, 대조군 백서태자와 실험군 백서태자로 구분한 후 실험군중 구개파열 백서 태자를 실험에 이용하였다(Fig. 1, Table 1). 총 6마리의 구개파열 백서태자를 얻어 3마리는 면역조직화학염색에, 다른 3마리는 Western blot 검사에 이용하였다.

1. 면역조직화학 염색

추출한 백서태자의 두경부를 10%중성 포르말린에 고정하고 cassette에 맞게 자른 후 5~10% nitric acid성분의 탈칼슘 용액을 이용하여 탈회를 시키고 70~100% alcohol로 단계적 탈수한 뒤에 xylene으로 투명시키고 48℃의 soft paraffin과 58℃의 hard paraffin에 embedding하여 냉동실에 30분 이상 보관한 후 microtome으로 4~5 μ m두께로 연속 박절편을 제작하고 ProbeOn Plus 슬라이드(Fisher



A. Control rat fetus B. Cleft-formed rat fetus

Fig. 1. Palate morphology of rat fetus on 20th day p.c.

Table 1. Incidence of palatal cleft in rat fetus

	Group 1	Group 2
Number of delivery	12	33
Number of cleft formed fetus	0	6

Group 1: control group

Group 2: BAPN administered group

Scientific, USA)에 부착한 후 충분히 건조시켰다. 염색은 ProbeOn Plus 슬라이드를 맞대서 생기는 capillary gap action 원리를 이용한 Microprobe System (Fisher Scientific, USA)을 사용하였고, 면역조직화학검사를 위해 LSAB (labeled streptavidine biotin, Dako Co, Denmark) kit를 이용하였으며, TGF- β (Santa Cruz, Polyclonal, USA) 일차항체를 1/50으로 희석하여 사용하여 30분간 침투시키고 이차항체로는 anti-mouse Ig G를 사용하여 10분간 부란시켰으며, 발색을 위해 AEC (Aminoethyl Carbazole, Zymed Co, USA)를 이용하였다. 그리고 streptavidine alkaline phosphatase로 10분간 처리하고 발색시킨 후, Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하고 탈수와 투명과정을 거친뒤에 건조시켜 glycerine gelatine으로 mounting한 후 검경하였다.

2. 면역조직화학 염색 결과 분석 방법

염색정도의 분석을 위해 슬라이드 표본을 저배율로 관찰하여 염색 양상이 미만성인가 또는 특정부위에 국한된 것인가를 판별하고 고배율로 TGF- β 이 어떤 세포에 양성으로 나

타나는가를 관찰하였다.

항체에 대한 양성반응을 관찰하여 전혀 염색성을 관찰할 수 없는 경우를 음성(-), 거의 염색성을 관찰할수 없는 경우를 경미(\pm), 중등도의 세포질내 염색상을 보이는 경우(+), 매우 강한 세포질내 염색상을 보이면서 양성세포가 밀집되어 있는 경우(++)로 판독하여 상대적인 4단계로 표현하고 동일한 병명의 여러 개 표본을 중복 검경하여 최빈 값을 선택하였다.

3. Western Blot Analysis

각각의 실험군과 대조군으로부터 상악 및 하악을 분리하여 TRI reagent (Montgomery, USA)로 단백질을 추출한 후 ELISA 분석과 분광흡광도를 이용하여 정량하고, 이 정량의 단백질을 SDS-page와 Western blot에 이용하였다. Protein standard marker와 단백질에 동량의 loading buffer를 첨가하고, 95 $^{\circ}$ C에서 denaturation시킨 후 8% SDS-page를 사용하여 전기영동한후 Coomassie brilliant blue 염색을 시행하였다. 전기영동한 gel을 polyvinylidene difluoride (PVDF, Bio-rad Co) membrane에 transfer시

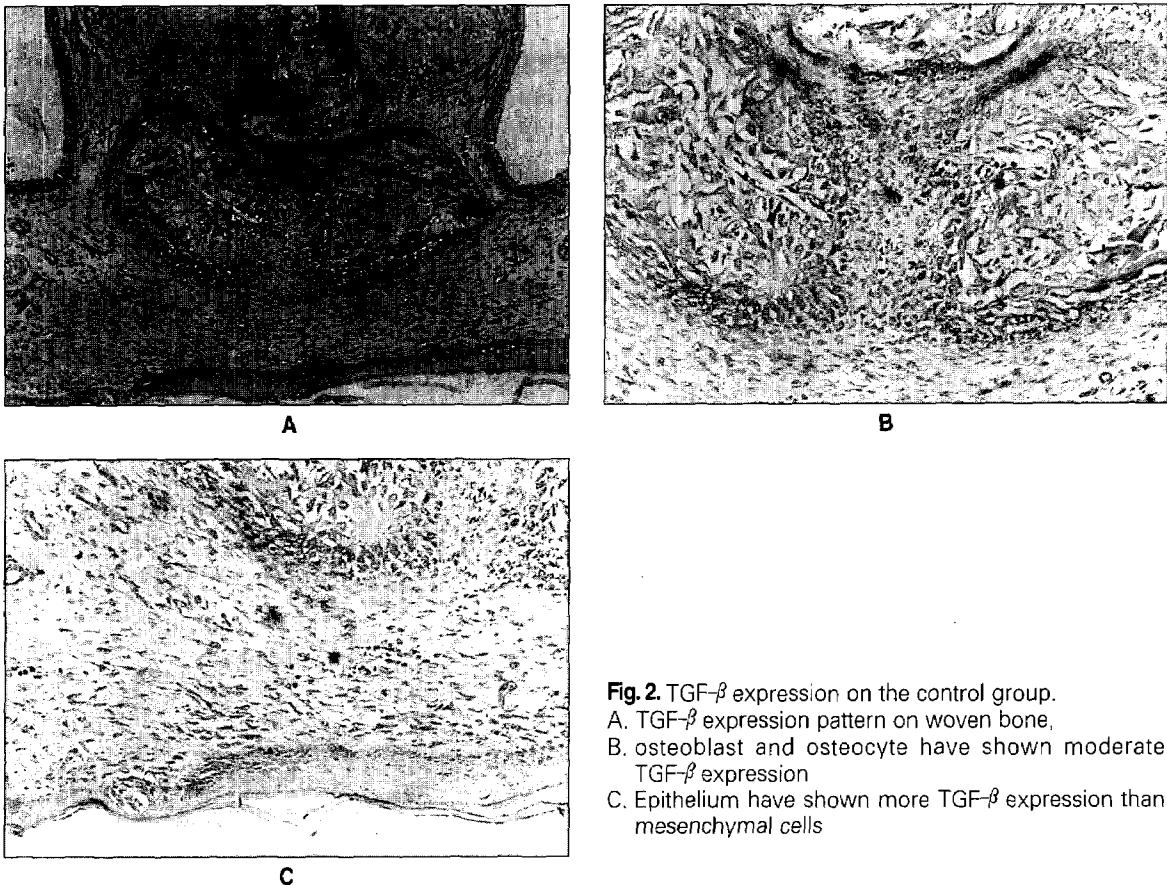


Fig. 2. TGF- β expression on the control group.
 A. TGF- β expression pattern on woven bone,
 B. osteoblast and osteocyte have shown moderate TGF- β expression
 C. Epithelium have shown more TGF- β expression than mesenchymal cells

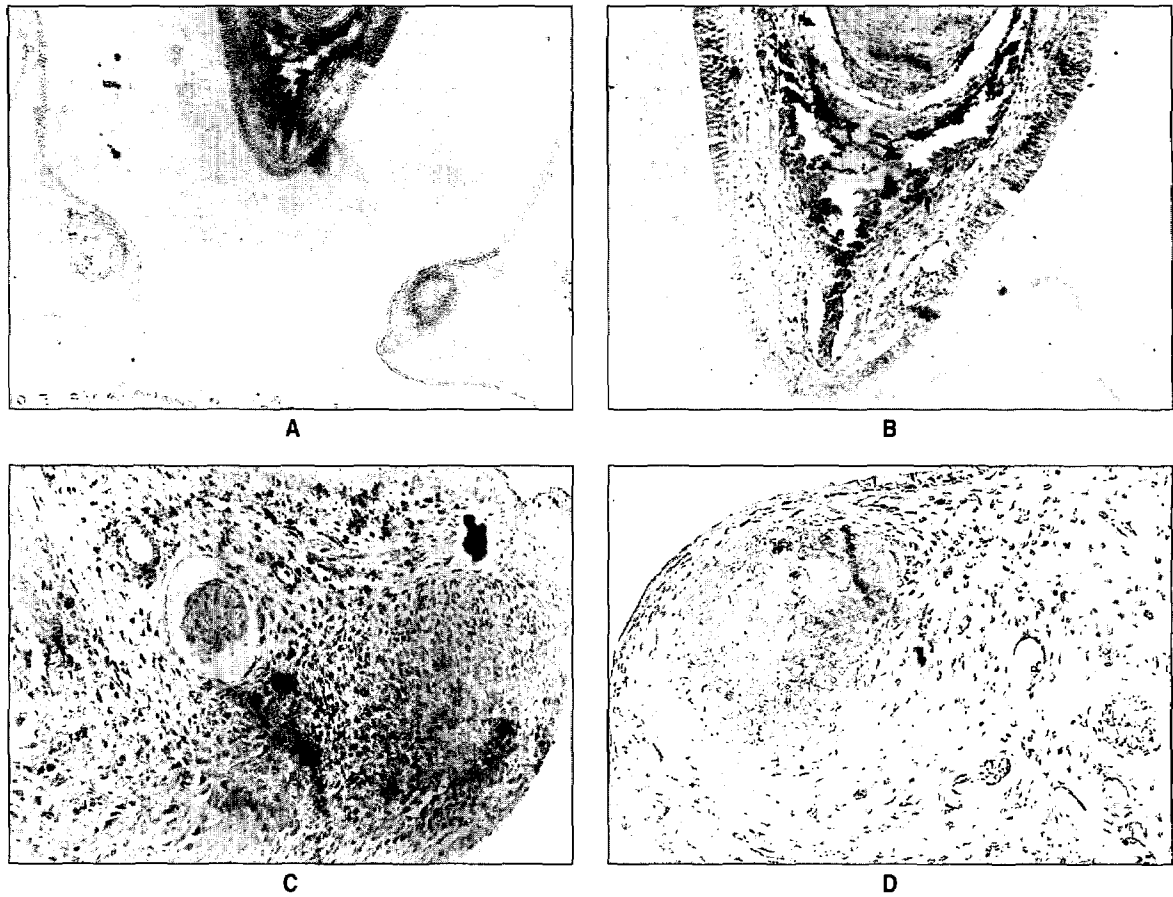


Fig. 3. TGF- β expression on cleft forming group.
 A. overall features of cleft palate mice.
 B. TGF- β expression pattern at woven bone area in nasal septum.
 C & D. TGF- β expression pattern at focal area in palatal process.

Table 2. Comparison of TGF- β expression patterns in both group

	osteoblast	osteocyte	Mesenchymal cell	Epithelial cell
Control group	++~+++	++	++	++
Cleft group	+~++	++	+	+

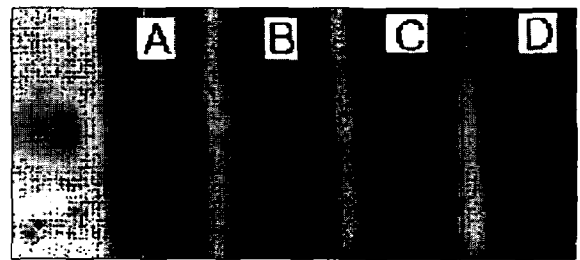


Fig. 4. Western analysis of TGF- β expression
 A: Maxilla of control group
 B: Mandible of control group
 C: Maxilla of cleft group
 D: Mandible of cleft group

키고, 일차 항체 anti-TGF- β (Zymed Co)와 이차 항체 mouse anti-Ig G를 각각 1시간씩 처리한 후 ECL chemiluminescence detection kit로 필름에 detection한 후 Image

Pro program을 이용하여 24kDa에 해당하는 밴드의 optical density를 측정하였다.

II. 연구 결과

1. 면역조직화학 염색

대조군에서는 백서태자의 상악 구개의 형태는 비연골과 횡적 구개돌기의 완벽한 융합이 보였지만(Fig. 2A), 구개열 백서의 구개형태는 상피 띠가 연속된 형태로 비연골과 수평구개돌기가 분리된 채로 관찰되었으며 구개의 전방부보다 후방부에서 더 파열도가 심하였다(Fig. 1, 3A).

대조군의 경우 TGF- β 발현 양상은 골아세포근처의 간엽조직에서 강하게 나타났지만 골양조직근처의 간엽조직에서는 중등도, 구개상피근처의 간엽조직은 경미한 발현을 보였으며, 구개중간부위의 융합부위에서의 골아세포 및 골세포는 중등도를, 상피세포에서는 중등도의 발현을 보였다.

반면 구개열군의 경우 간엽조직의 TGF- β 발현 양상은 골양조직 근처에서는 중등도에서 경미한 발현을, 상피근처에서는 경미한 발현을 보였다. 구개열군의 상피세포의 TGF- β 발현 양상은 비둘기에서는 경미한 발현을 보였으며 상피의 두께는 고른 양상을 보였다. 골양조직은 대조군에 비해 적은 양 분포되었으며, 이때 골아 세포는 중등도에서 경미한 발현을, 골세포에서는 중등도의 발현을, 상피세포에서도 중등도의 발현 양상을 보였다.

2. Western Blot analysis

Band의 optical density 확인을 위해 Image Pro program을 사용한 결과 구개열군의 상악에서 TGF- β 발현이 대조군의 것에 비해 약하고 폭경이 얇은 형태를 보였다. 반면 구개파열군의 하악은 대조군의 하악 보다 더 뚜렷한 형태를 보였다(Fig. 4).

IV. 고 찰

구개파열은 유전과 환경적 요인에 의해 나타나는데, 이런 요인들은 유전자 발현과 조절 요소, 리간드 수용분자, 두개신경능세포의 이주, 구개의 근심돌기의 저발육을 초래하는 간엽조직의 발육 이상등에 영향으로 일어난다^{1,20)}. 동물실험에서 주조직항원적합체(major histocompatibility complex, MHC)가 기형유발약제에 의한 구개파열에 관련되고, 이런 주조직항원적합체는 백서에서는 17번 염색체, 사람에서는 6번 염색체에 존재한다²¹⁾. Melnick 등은 스테로이드 유발 구개파열에 민감한 종과 저항하는 종으로 나누었는데²²⁾, 본 연구에서도 전체 BAPN투여 받은 백서태자 33마리에서 6마리만 발생한 것으로 보아 27마리는 구개파열 유도 약물에 저항을 갖는 종으로 사료된다²³⁾. 하지만 이런 유전적 특이성을 갖는 사람에 대한 연구는 보고되지 않는다. 실험

적 연구로 태반 침투성, 유전적 안정성, 임신 기간의 단축등의 이유로 백서모델은 구개파열연구에 많이 사용된다²²⁾. 구개열을 유도하기 위해 비타민 A(retinoic acid)과 코티코스테로이드, cyclophosphamide, diazo-oxo-norleucine, 항발작성 약제등을 사용하는데^{4,8,10,24,23)}, 그 중 pyridoxal phosphate는 핵내 수용체 단백질과 결합하고 DNA의 전사를 유전자 발현을 변조하여 단백질 합성을 다르게 하는 방식으로 호르몬과 같은 방식으로 작용하고, 또한 호르몬의 재흡수를 억제하는 조요소(cofactor)로 작용한다¹¹⁾. 이러한 호르몬 방식을 취하는 것은 안드로젠과 에스트로젠, 프로게스테론, 글루코코티코이드, 칼시트롤, 레티놀, 레티노산, 갑상선 호르몬등이 해당된다^{25,26)}. 가령 글루코코티코이드는 세포내 결합자리를 증가시켜 간엽조직의 분열과 성장을 일으키지만 너무 많은 양 투여하게 되면 간엽조직의 분열을 억제하고 세포외 기질 합성을 억제하게 된다^{6,11,23)}. 이 연구에서는 BAPN을 사용하여 구개파열을 유도하였는데, 이 약제는 신생 폴라겐의 교차결합을 억제하여 맥켈씨 연골 합성을 억제하고 하악의 길이 성장이 억제되어 혀의 위치 변화로 구개형성과정에 영향을 주게된다고 보고되나 정확한 약동적 기전은 보고되지 않는다^{10,26)}. 본 연구에서 구개열 백서태자 발생율이 현저히 낮았는데, 백서의 특이한 gene-type에 영향을 받아 발생단계에서 기형유발 약제에 선택적 감수성이 다르다는 것을 암시한다^{26,39)}.

백서의 구개형성은 임신 13.5일째 비둘기가 구강쪽을 향해 자라고, 14.5일째 양 구개돌기가 횡적으로 자라고, 15.5일째 비둘기 및 구개돌기가 만나 융합되어 17일째 완성되고, 20일이나 21일째 출산을 하게 된다^{27,42)}. 구개형성과정에 외인성요소와 내인성요소에 의해 이루어지게 되는데, 외인성 요소로 혀의 위치, 비연골과 1차 구개의 수직 성장, 두개저의 굴곡도, 맥켈씨 연골의 성장이고, 내인성 요소로 세포이주, 상피-간엽 형질 전환, 세포외 기질의 합성과 축적, 세포 분열등이 관여한다^{10,23)}. 내인적 요소로 구개간엽은 두개신경능에서 유래하여 구개돌기가 횡적으로 자라 근심부위의 상피가 결합된 후 정중부 상피가 사라지고 간엽조직이 교통하게 되어 구개가 완성된다³⁰⁾. 이런 상피의 사라짐은 일종의 프로그램된 세포의 자가 죽음이라는 학설³¹⁾과 상피가 간엽조직으로 형질 전환 한다는 학설^{7,8)}이 존재한다. 구개간엽에 영향을 주는 레티노산에 의한 구개열 백서 연구에서와 본 연구에서 구개돌기의 근심 상피 두께가 다른 곳에 비해 얇게 나타났는데, 이런 현상이 상피-간엽의 형질전환의 전단계인지 아니면 세포의 자가죽음 현상의 전조인지 알 수 없었다^{24,33)}.

TGF- β 는 disulfide-linked dimmers로 분자량은 25kd로 신생 백서에 피하 투여시 섬유화와 혈관 형성을 유도하며, 골아세포의 형성과 골 재흡수를 억제하는 기능을 갖는다고 보고된다²⁰⁾. 외인적으로 TGF- β 를 투여하게 되면

fibronectin, collagen type III, IV, V 같은 세포외 기질의 합성을 증가시키고, collagen type I 과 EGF합성을 억제한다고 보고된다^{16,34}. 성장요소중 하나인 TGF- β 는 콜라겐과 글라코아미노당의 합성을 초래하여 구개간엽을 분열시키는 방법으로 2차 구개 형성에 관여한다고 보고된다¹⁷. Linask는 TGF- β 를 투여시 구개간엽조직에서 반응은 사람에서 분열을 촉진하지만 백서에서는 분열을 감소하는 것으로 보고했으며, 이러한 차이가 종의 차이에 의한 것인지 아직 밝혀지지 않았다³⁵. TGF- β 는 다시 TGF- β 1과 TGF- β 2, TGF- β 3로 분류된다³⁶. 실험적 연구에 의하면 TGF- β 1과 TGF- β 2는 기능적으로 유사한 영향을 보이나 모든 조직에서 기능적으로 동일한 기능을 수행하지 않는 것으로 보이며, 골아세포의 이주와 화학주성 및 결합조직의 콜라겐 합성을 자극하는 것으로 보고된다³⁷⁻³⁹. 백서의 구개형성에 TGF- β 3가 구개돌기의 수직 상피에 처음 발현되었다가 TGF- β 2는 횡적 상피에 나타나고 융합되는 곳의 근심 상피에 나타난다^{16,18,40-42}. 이러한 세포의 복잡한 과정이 유전적인 요인에 의하거나 환경적인 요인에 의해 교란되게 되면 구개열을 초래하게 된다^{21,43}. 본 연구의 면역조직화학 염색에서 구개열 백서의 간엽조직의 TGF- β 발현이 대조군에 비해 적게 발현되는 결과를 보여 BAPN약물에 의한 구개열 백서에서 TGF- β 발현이 영향을 받게 되었음을 추론할 수 있었다³³. 또한 Western blot분석을 통해서도 구개열 백서와 대조군 백서의 비교에서 상악골내 TGF- β 발현의 차이가 이를 입증해주고 있지만, 하악골에서 발현이 오히려 구개열군에서 더 강하게 발현된 것은 더 연구가 필요한 것으로 사료된다.

V. 결 론

임신 9일째 백서 4마리를 구입하여 1마리의 대조군과 3마리의 실험군으로 구분한 후, beta-aminopropionitrile을 임신 13일째 1g/1kg 체중 비율로 실험군에 투여하였다. 그 후 임신 20일째 백서를 모두 희생하여 대조군에서는 12마리, 실험군에서는 33마리의 백서 태자를 얻어 그 중 실험군에서 총 6마리의 구개열 백서태자를 얻었다. 구개열 백서태자 6마리를 각3마리씩 면역조직화학염색과 Western blot검사를 위해 나누었고, 구개열군의 TGF- β 발현 양상은 다음과 같은 결과를 보였다.

1. 면역조직화학염색에서 구개열 백서의 간엽조직에서 TGF- β 발현 양상은 대조군에 비해 현저히 낮은 형태를 보였지만, 구개열 백서의 골아세포와 골세포에서의 TGF- β 발현 양상은 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았다.
2. Western blot분석에서 구개열 백서의 상악골 TGF- β 밴드 굵기와 두께는 정상군에 비해 얇고 희미한 양상이었다.

참고문헌

1. Balling R, Mutter G, Gruss P, Kessel M. Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression by the homeobox gene. *Cell* 58: 337-47, 1989.
2. Slavkin HC. Congenital craniofacial malformations: identifying individuals at risk. *Ear Nose Throat J* 58:1-8, 1979.
3. Ferguson MWJ. Palate development. *Development*, 103: 41-60, 1988.
4. Slavkin HC. Incidence of cleft lips, palates rising. *JADA*. 71.:61-5, 1992.
5. Millard R. Cleft craft: the evolution of its surgery: 1. the unilateral deformity. Little brown and company boston. 1976. 1st Edi. :3-17.
6. Ferguson MWJ. The orofacial region. *Textbook of fetal and perinatal pathology*. London: Blackwell 1991:843-50.
7. Fitchett JE, Hay ED. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev. Biol.* 131: 455-74, 1989.
8. Diewert VM, Pratt RM. Selective inhibition of mandibular growth and induction of cleft palate by diazo-oxo-nor-leucine(DON) in the rat. *Teratology*. 20:37-50, 1979.
9. Dolovich LR, Addis A, Vaillancourt JM, Power JD, Koren G. Benzodiazepine use in pregnancy and major malformations or oral cleft. *Bio Med J* 26:839-43, 1998.
10. Diewert VM. Correlation between alterations in Meckel's cartilage and induction of cleft palate with β -aminopropionitrile in the rat. *Teratology*. 24:43-52, 1981.
11. Miller TJ. Cleft palate formation: a role for pyridoxine in the closure of the secondary palate in mice. *Teratology*. 6:351-56, 1972.
12. Pisano MM, Green RM. Hormone and growth factor involvement in craniofacial development. *IRCS Med. Sci.* 14:635-40, 1986.
13. Pratt RM. Hormones, growth factors and their receptors in normal and abnormal prenatal development. *Teratology*. 189-217, 1984.
14. Pratt RM. Role of epidermal growth factor in embryonic development. *Curr. Topic Dev. Biol.* 22:175-93, 1987.
15. DeLarco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells *Proc. Natl. Acsd. Sci. USA*. 75: 4001-5, 1978.
16. Roberts AB, Sporn MB, et.al Transforming-growth factor type- β rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Nam. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 4176-71, 1986.
17. Sandberg M, Vuorio T, Hirvonen H, Alitalo K, Vuorio E. Enhanced expression of TGF- β and c-fos mRNAs in the growth palate of developing human long bones. *Development*. 102:461-70, 1988.
18. Schmid P, Cox D, Bilbe G, Maier R. Differential expression of TGF- β 1, β 2 and β 3 genes during mouse embryogenesis. *Development* 111:117-30, 1991.
19. Sporn MB, Robert AB, Wakefield LM, De Crombergghe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 105: 1039-45, 1987.
20. Holland PWH. Homeobox genes and the vertebrate head. *Development* 103S:17-24, 1988.
21. Slavkin HC. Regulatory issues during early craniofacial development: a summery. *Cleft Palate J*. 27:101-9, 1991.
22. Melnick M, Shields ED, Burzynski NJ. *Clinical dysmorphology of orofacial structures*. Littleton, MA: PSG Publishing: 1982.

23. Montenegro MA, Rojas M, Dominguez S, Rosales CJ. Differences in extracellular matrix components and cell density during normal and dexamethasone-treated 2ndary palate development in two strains of mice with different susceptibility to glucocorticoid induced-clefting. *J Craniofac Genet Dev Biol* 18:100-6, 1998.
24. Abbott BD, Pratt RM. Retinoids and EGF after embryonic mouse palatal epithelial and mesenchymal cell differentiation in organ culture. *J Craniofac. Gen. Dev. Biol.* 7:219-240, 1987.
25. Macrae R. Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol 7. London Academic Press.1993:4788-4804.
26. Yoneda T, Pratt RM. Vitamin B6 reduces cortisone-induced cleft palate in the mouse. *Teratology.* 26:255-58, 1982.
27. Jacobsson C, Granström G. Effects of vitamin B6 on beta-aminopropionitrile-induced palatal cleft formation in the rat. *Cleft palate J.* 34:95-100, 1997.
28. Foppreman DM, Sharpe PM, Ferguson MWJ. Comparative biochemistry of mouse and chick secondary palate development in vivo and in vitro with particular emphasis on extracellular matrix molecules and the effects of growth factors on their synthesis. *Arch Oral Biol.* 36:457-71, 1991.
29. Chai Y, Mah A, Crohin C, Groff S. Specific transforming growth factor- β subtypes regulate embryonic mouse Meckel's cartilage and tooth development. *Dev Biol* 162:85-103, 1994.
30. Hall GK, Sunetra E. Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cell-derivatives. *Int J Dev Biol.* 35:367-87, 1991.
31. Shuler CF, Guo Y, Majumder A, Luo R. Molecular and morphologic changes during the epithelial-mesenchymal transformation of palatal shelf medial edge epithelium in vitro. *Int J Dev Biol* 35:323-32, 1991.
32. Carette MJM, Ferguson MWJ. The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: an analysis of DiI labeling and confocal microscopy. *Development* 114:379-88, 1992.
33. Degitz SJ, Morris D, Foley GL, Francis BM. Role of TGF- β in RA-induced cleft palate in CD-1 mice. *Teratology* 58:197-204, 1998.
34. Rizzino A. Transforming growth factor- β : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Dev Biol* 130:411-22, 1988.
35. Linask KK, D'Angello M, Gehris AL, Greene RM. TGF- β receptor profiles of human and murine embryonic palate mesenchymal cells. *Exp Cell Res.* 192:1-9, 1991.
36. Thorp BH, Anderson I, Jakowlew SB. Transforming growth factor- β 1, - β 2 and β 3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick. *Dev.* 114:907-11, 1992.
37. Holley RW, Armour R, Baldwin JH. Density-dependent regulation of growth of BSC-1 cells in cell culture: growth inhibitors formed by cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:1864-66, 1978.
38. Wahl SM, Hunt DA, Wakerfield LM, McCartney-Francis N, Whal LM, Robert AB, Sporn MB. Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 263:7646-54, 1987.
39. Warkany J. Congenital malformation: notes and comments. Chicago: Year book Medical Publishers: 1971.
40. Gehris AL, D'angelo M, Greene RM. Immunodetection of the transforming growth factors (1 and 2) in the developing murine palate. *Int J Dev Biol.* 35:17-24, 1991.
41. Fitzpatrick DR, Denhez F, Kondaiiah P, Akhurst RJ. Differential expression of TGF- β isoforms in murine palatogenesis. *Devl* 109:585-95, 1990.
42. Pelton RW, Hogan LM, Miller DA, Moses HL. Differential expression of genes encoding TGF- β 1, β 2, and β 3 during murine palate formation. *Dev Biol* 141:456-60, 1990.
43. Shils H, Olson JA, Shike M. Modern nutrition in health and diseases. Vol 1. 8th Edi. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994:383-92.

저자연락처

우편번호 570-711
 전라북도 익산시 신룡동 344-2
 원광대학교 치과대학 교정학교실
 태 기 출

원고 접수일 2001년 03월 13일
 게재 확정일 2001년 04월 08일

Reprint requests

Ki-Chul Tae
 Dept of Orthodontics, College of Dentistry Wonkwang Univ.
 344-2, Sinyoung-Dong, Iksan-City, Chunbuk, 570-711, Korea
 Tel. 82-63-850-1921, Fax 82-63-852-4939

Paper received 13 March 2001
 Paper accepted 8 April 2001