

## 염증성 치은 상피와 치낭의 표피성장인자 수용체의 발현 및 실험적 치아이동에 미치는 영향에 관한 연구

김 영 호<sup>1)</sup> · 배 창<sup>2)</sup>

동소 mRNA 보합결합법과 면역조직 화학적 염색법을 이용하여 정상 치은 상피와 염증성 치은 상피의 표피성장인자 수용체의 발현을 관찰하여 치은 상피의 염증이 있어서 표피성장인자 수용체의 역할을 연구하고, 타액에 노출되지 않는 치낭 조직에 있어서 표피성장인자 수용체의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동소 mRNA 보합결합법상 정상 치은 상피에서 EGFR mRNA는 거의 기저세포층에 국한되어 나타났으며, 극세포층은 약양성을 보였고 과립층과 각화층에서는 발현되지 않았다.
2. 면역조직 화학적 염색법상 정상 치은 상피에서 EGFR 단백질은 거의 각화층과 과립층에 국한되어 나타났으며, 극세포층은 약양성을 보였고 기저세포층에서는 발현되지 않았다.
3. 동소 mRNA 보합결합법상 염증성 치은 상피에서 EGFR mRNA는 각화층을 제외한 전층에 걸쳐서 균일하게 분포하였다.
4. 면역조직 화학적 염색법상 염증성 치은 상피에서 EGFR 단백질은 기저세포층에서 각화층에 걸쳐서 균일하게 분포하였다.
5. 치낭 조직에서는 동소 mRNA 보합결합법과 면역조직 화학적 염색법 모두에서 Malassez 상피세포 잔존물에 강하게 염색이 되었고, 그 외의 주위 조직에서는 발현되지 않았다.

이상의 결과에서 볼 때, 염증성 치은 상피에서 EGFR의 과발현과 치낭 조직의 Malassez 상피세포 잔존물에서 다량의 EGFR이 존재하는 것으로 미루어, 이는 구강 환경에 가해질 수 있는 손상에 대하여 생체의 항상성을 유지하기 위한 반응으로 여겨진다.

( 주요단어 : 염증성 치은상피, 표피성장인자 수용체, EGFR mRNA, 생체항상성 )

### I. 서 론

구강 점막에서 치은의 염증은 leukocyte, fibroblast, endothelial cell 등의 여러 종류의 세포간의 상호작용에 의하여 조절되며<sup>30)</sup> 성장인자(growth factors)와 matrix macromolecule들의 복잡한 내부 교류에 의하여 매개된다<sup>29)</sup>. 이러한 성장인자는 mononuclear

cell에 의해 생성되는 호르몬과 유사한 단백질이며, 염증 반응의 진행과정에 기여하는 것으로 보고되었다<sup>41)</sup>.

표피성장인자(Epidermal growth factor, EGF)는 염증 반응에 기여하는 cytokine 중의 하나이며, 그 외의 다른 생리적, 병리적 과정에도 관여한다<sup>9)</sup>. EGF는 쥐의 악하선에서 처음 발견되었으며 신생 쥐에서 질치의 맹출과 개안에 관여하는 것으로 알려졌다<sup>13)</sup>. 구강 점막에서 상피 세포를 포함한 많은 종류의 세포에서 강력한 유사분열물질(mitogen)로 알려져 있는

<sup>1)</sup> 가톨릭 대학교 치과대학 치과학교실 교정과, 전임강사

<sup>2)</sup> 가톨릭 대학교 치과대학 치과학교실 교정과, 교수

EGF는 표피<sup>14)</sup>와 구강 상피<sup>36)</sup>에서 세포의 증식과 각화를 자극하며, 또한 발육하는 치아의 치낭 내의 세포들에 강하게 결합한다<sup>31)</sup>.

EGF는 표적 세포(target cell)의 세포막에서 그 특별한 수용체인 표피성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor, EGFR)와 결합하며 세포내부영역(endosomal compartment)으로 내재화(internalization) 된다<sup>10)</sup>.

구강 점막에서의 EGFR의 발현에 관한 연구는 주로 면역조직화학적 염색법<sup>3,26,32)</sup>과 방사선 자기법<sup>11,38)</sup>을 이용하여 EGFR 단백을 관찰하며, 최근에는 EGFR mRNA에 대한 특이성을 갖는 oligonucleotide 탐식자를 이용한 동소 mRNA 보합결합법의 개발로 EGFR mRNA의 관찰이 가능하게 되었다<sup>24)</sup>.

이에 본 논문은 동소 mRNA 보합결합법과 면역조직화학적 염색법을 이용하여 정상 치은 상피와 염증성 치은 상피의 표피성장인자 수용체의 발현을 관찰하여 치은 상피의 염증이 있어서 표피성장인자 수용체의 역할을 연구하였으며, 또한 치은 상피와 달리 타액 내 EGF에 노출되지 않는 치낭 조직에 있어서 표피성장인자 수용체의 발현을 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

35명의 환자에게서 소구치 부위의 치은 상피를 생검하여 검사하였다. 염증성 치은 상피는 25명의 adult periodontitis 환자(남자 11명, 여자 14명, 30-60세, 평균연령 48세)에게서 치은 박리 소파수술을 시행 중 소구치의 협측 치은을 2×3mm가 되도록 절제하였으며 생검한 협측부위의 probing depth는 8-14mm이었다. 정상 치은 상피는 교정 치료를 위해 내원한 환자 중 소구치 발치가 필요한 환자 10명(남자 5명, 여자 5명, 16-25세, 평균연령 18세)에게서 소구치 부위의 협측 치은을 2×3mm 되도록 절제하였으며 염증이 나 플라그, probing 시의 출혈이 없었고 probing depth는 2-3mm이었다.

치낭 조직은 매복된 소구치 발치가 필요한 환자 10명을 대상으로(남자 6명, 여자 4명, 8 - 13세, 평균 연령 10세) 치아의 발거 후 그 주위의 치낭을 조심스럽게 박리하였다.

### 2. 조직 표본 제작

떼어낸 조직은 10% 포르마린 용액에 고정하고 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매조직은 4-5μm 두께로 연속 절편하여 동소 mRNA 보합결합법의 조직은 규소와 양이온이 처리된 슬라이드(ProbeOn™ Plus, Fischer Scientific Co., Pittsburgh, PA, U.S.A.)에 부착시키고, 면역조직화학적 염색법의 조직은 규소 처리된 슬라이드(ProbeOn™, Fischer Scientific Co., Pittsburgh, PA, U.S.A.)에 부착시켜 급속한 온도조절 기능이 있는 MicroProbe™ Staining Station (Biomed Corp., Foster City, CA, U.S.A.)<sup>34)</sup>에서 Brigati 등<sup>4)</sup>(1988)에 의해 개발된 모세관법을 이용하였다.

### 3. 동소 mRNA 보합결합법

EGFR mRNA 동소 보합결합법은 Iezzoni 등<sup>24)</sup>의 방법을 수정 보완하여 시행하였다. 조직 절편을 1:3의 비율로 혼합된 xylene과 Hemo-De<sup>R</sup> (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U.S.A.)의 혼합액에 1분간 5회 반복하여 접촉시켜 파라핀을 완전 제거시키고 100% 알코올에서 30초씩 2회에 걸쳐 방치하여 탈수화시키고 표면장력을 낮추었다. 이와같이 처리된 절편은 펩신 효소 용액에 110°C에서 3분간 방치하여 표적 EGFR-mRNA에 탐식자가 용이하게 접근할 수 있도록 투과화전처리(prepermeabilization)를 실시하였다. 보합결합에 적합한 점액도를 유지하기 위한 cocktail 용액은 sodium chloride(675 mM), sodium citrate(138mM), monobasic sodium phosphate(12mM), dibasic sodium phosphate(63mM)들과 화학적 핵산 변형체인 ultraformamide(AMRESCO, U.S.A.)와 chondroitin sulfate(0.5% w/v; Calbiochem Co., U.S.A.)를 넣어 제조하였다. Tris 완충액(pH 7.5) 1μl에 EGFR-mRNA 검출에 특이성이 알려진 1μg의 5'(GGA-GCG-CTG-CCC-CGG-CCG-TCC-CGG)3' 핵산배열의 biotinylated oligonucleotide probe를 용해시킨 용액과<sup>25,33)</sup> 핵산의 변형을 돕기 위한 9-sequenced random primer(Research Genetics, U.S.A.)를 용해시킨 용액을 만들어<sup>25)</sup> 미리 준비한 cocktail 용액으로 각각 1:2,000과 1:0,000으로 희석, 혼합하여 완전한 보합결합액을 만들어 동소 보합결합을 시행하였다. 즉, 92.0°C에서 10분간 방치하여 실험조직 내 표적 핵산의 변형을 유발시키고 40°C에서 30분간에 걸쳐 reannealing 반응을 통해 적합한 보합결합을 유

도하였다. 이와 같은 동소 보합결합 결과는 5× SSC 용액과 3× SSC 용액으로 각각 30초씩 3회 세척하여 비특이 보합결합을 제거시켰다. 그 뒤, avidin conjugated alkaline phosphatase(Dako A/S, Denmark)로 45°C에서 15분간 특이 보합결합 내 biotin과 확인결합케 한 후, chemical enhancer를 30초씩 3회 적용시켰다. 그후 이들을 naphthol AS-MX phosphate(Sigma, U.S.A.)와 Fast Red TR salt(AMRESCO, U.S.A.)로 구성된 chromogen으로 45°C에서 15분간 발색시켜 보합결합반응을 확인한 후, hematoxylin으로 대조염색하고, Crystal/Mount(Biomedica Corp., Foster City, CA, U.S.A.)로 mounting 하여 관찰하였다. 음성대조군은 조직 표본의 protease-free RNase 전처리와 biotinylated oligonucleotide probe 대신 antisense oligonucleotide probe의 교체, 그리고 과도한 상보적인 sense oligonucleotide의 사용으로 특이성 여부를 검사하였으며, 어떠한 양성 반응도 검출되지 않았다.

4. 면역조직화학적 염색법

EGFR 단백질의 검출을 위한 면역조직화학적 염색법은 고 등<sup>1)</sup>의 방법을 수정 보완하여 시행하였다. 조직 절편을 1:3의 비율로 혼합된 xylene과 Hemo-De<sup>R</sup> (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U.S.A.)의 혼합액에 1분간 5회 반복하여 접촉시켜 파라핀을 완전 제거시키고 95% 알코올에서 30초씩 3회에 걸쳐 방치하여 탈수화시켰다. 이 절편을 펩신 효소 용액에서 실온에서 2분간 방치하였던. 실험 조직 내의 EGFR의 항원을 적합하게 재활성화시키기 위하여 Target Unmasking Fluid(PharMingen, San Diego, CA, U.S.A.) 내에서 95°C에서 5분간 2회 방치하였다. 1× Automation buffer로 씻고 일차항체인 EGFR1(Dako Co., Carpinteria, CA, U.S.A.) 항체를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 처리한 후 1× Automation buffer로 3회 씻어내었다. 일차항체의 검출을 위한 이차항체는 biotin이 표지된 anti-mouse IgG를 이용하여 40°C에서 30분간 부치한 후 1× Automation buffer로 3회 씻어내었다. 그 후 면역 반응 결과를 확인하기 위하여 avidin conjugated alkaline phosphatase(Dako A/S, Denmark)로 45°C에서 15분간 적용하고, chemical enhancer를 30초씩 3회 적용시켰다. 이들을 naphthol AS-MX phosphate(Sigma, U.S.A.)와 Fast Red TR salt(AMRESCO, U.S.A.)로 구성된 chromogen으로 45°C에서 15분간 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조

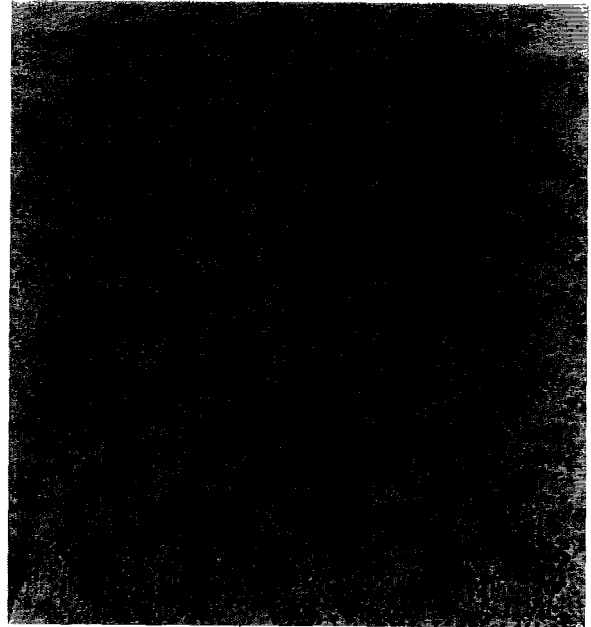


Fig. 1. 동소 mRNA 보합결합법상 정상치은상피에서의 EGFR mRNA의 발현 (×100) : 염색이 주로 기저세포층에 국한되어 있다

염색하고, Crystal/Mount(Biomedica Corp., Foster City, CA, U.S.A.)로 mounting 하여 관찰하였다. 음성대조군은 일차 항체를 제외한 항체 희석액을 반응시켜 실험에 이용하였다.

III. 연구 성적

1. 정상치은상피에서 EGFR mRNA의 발현

동소 mRNA 보합결합법상 정상 치은 상피에서 EGFR mRNA는 거의 기저세포층에 국한되어 나타났으며, 극세포층은 약양성을 보였고 과립층과 각화층에서는 발현되지 않았다(Fig. 1). 10명의 환자의 모든 정상 치은 상피의 조직 표본에서 같은 소견을 보였다.

2. 정상치은상피에서 EGFR 단백질의 발현

면역조직화학적 염색법상 정상 치은 상피에서 EGFR 단백질은 거의 각화층과 과립층에 국한되어 나타났으며, 극세포층은 약양성을 보였고 기저세포층에서는 발현되지 않았다(Fig. 2). 10명의 환자의 모든 정상 치은 상피 조직에서 같은 소견을 보였다.



Fig. 2. 면역조직화학적 염색법상 정상치은상피에서의 EGFR 단백질의 발현(×100). 염색이 주로 각화층과 과립층에 국한되어 있다



Fig. 4. 면역조직화학적 염색법상 염증성 치은 상피에서 EGFR 단백질의 발현 (×100). 염색이 치은 상피의 전층에 걸쳐서 균일하게 분포되어있다.



Fig. 3. 동소 mRNA 보합결합법상 염증성 치은 상피에서 EGFR mRNA의 발현(×100). 염색이 각화층을 제외한 전층에 걸쳐서 균일하게 분포되어있다.

### 3. 염증성 치은 상피에서 EGFR mRNA의 발현

동소 mRNA 보합결합법상 염증성 치은 상피에서 EGFR mRNA는 각화층을 제외한 전층에 걸쳐서 균일하게 세포질에 분포하였으며 기저세포층에서 각화층으로 이행되는 양상을 보였다(Fig. 3). 25명의 환자의 모든 염증성 치은 상피 조직에서 같은 소견을 보였다.

### 4. 염증성 치은 상피에서 EGFR 단백질의 발현

면역조직화학적 염색법상 염증성 치은 상피에서 EGFR 단백질은 전층에 걸쳐서 균일하게 세포질에 분포하였으며 각화층에서 기저세포층으로 이행되는 양상을 보였다(Fig. 4). 25명의 환자의 모든 염증성 치은 상피 조직에서 같은 소견을 보였다.

### 5. 치낭 조직에서 EGFR mRNA와 EGFR 단백질의 발현

치낭 조직에서는 동소 mRNA 보합결합법과 면역



Fig. 5. 치낭 조직에서 EGFR의 발현( $\times 200$ ). Malassez 상피세포 잔존물이 oval nests 형태로 분포하며 강하게 염색이 되어있다.

조직 화학적 염색법 모두에서 Malassez 상피세포 잔존물에 강하게 염색이 되었고, 그 외의 주위 조직에서는 발현되지 않았다(Fig. 5).

#### IV. 고 찰

EGF는 여러 조직에서 세포의 증식과 분화를 조절하고 창상의 치유를 촉진하는 것으로 알려져 있으며<sup>5)</sup>, EGFR은 쥐<sup>20)</sup>와 사람의 피부<sup>16)</sup>에서 증식 능력을 지닌 조직의 basement membrane 위의 상피 세포에서 발견이 된다. 상피 세포에서 EGFR의 발현은 많은 악성 종양<sup>21,42)</sup>에서 보고되었으며 또한 정상 구강 점막과 양성 종양에서도 관찰되었다<sup>27)</sup>.

EGFR은 세포외부영역과 세포내부영역의 두가지 기능적 영역으로 나누어지며 이는 짧은 경막(trans-membrane)으로 연결되어있다<sup>8,40)</sup>. 세포외부 영역에 리간드(ligand)가 결합하면 세포내부영역 내의 타이로신 카이네이즈(tyrosine kinase)의 활성화를 포함한 여러가지 세포내 반응을 일으키며, 이 활성화로 인하여 수용체 자체와 다른 표적 세포 단백질의 포스포릴레이션(phosphorylation)을 일으킨다<sup>15,17)</sup>.

EGF과 EGFR의 검출을 위하여 모노클로날 항체

(monoclonal antibody)를 이용한 면역조직화학적 염색법이 많이 사용되어져 왔다. 면역조직화학적 염색법은 다른 배위자결합법이나 단백질검출법 등과 비교하여 그 특이성이나 민감성이 낮지 않다는 보고들이 있으나<sup>2,23)</sup>, 단일클론항체가 A 혈액형 항원과 교차 반응을 일으켜 위양성 결과가 나올 수 있고<sup>19)</sup> 고정 과정 중의 항원의 변성<sup>28)</sup>이 보고된 바 있다.

최근에 유전자 발현에 있어서 동소 mRNA 보합결합법을 이용한 조직 표본의 특정 mRNA의 검출이 가능해지면서 기초의학과 임상의학에서 널리 시행되고 있는데, 종래의 면역조직화학적 염색이 가지는 장점과 더불어 동소 mRNA 보합결합법은 다음과 같은 장점이 있다. 첫째, stringency의 증가로 유전자 산물의 검출에 특이성이 높고 둘째, 단백질의 검출에 비해서 mRNA는 translation 중의 결합이나 posttranslational modification을 피할 수 있고 셋째, 호르몬과 같이 세포 내 저장된 물질의 경우 검출이 용이하지 않아 위음성의 가능성이 높는데 이러한 점을 보완해 주고 넷째, 민감성이 높으며 다섯째, 세포에서 더 좋은 국소화를 볼 수 있다는 점이다<sup>35)</sup>.

저자들은 EGFR mRNA를 관찰하기 위하여 동소 mRNA 보합결합법을, EGFR 단백을 관찰하기 위하여 면역조직화학적 염색법을 시행하였는데, 두 방법 모두 양성 반응이 세포질에서만 관찰되었다. EGFR이 세포막 단백질이면서 세포질 염색이 되는 이유는 확실치는 않으나 ligand와 결합 후에 빠르게 일어나는 EGFR의 내재화 때문일 것으로 추측된다<sup>23)</sup>.

정상 치은 상피에서 EGFR의 분포에 대하여 동소 mRNA 보합결합법의 결과와 면역조직화학적 염색법의 결과와는 서로 상반되어 보인다. 어떤 문헌들은<sup>11,21,27)</sup> 저자들의 동소 mRNA 보합결합법의 결과와 일치하며, 어떤 문헌들은<sup>1,12)</sup> 저자들의 면역조직화학적 염색법의 결과와 일치한다. 이러한 불일치에 대한 원인은 확실치는 않으나 EGFR의 발현이 세포의 분화도와 관계되는 것으로 보인다<sup>1)</sup>. 즉, 증식하고 있는 기저세포층에서 EGFR mRNA의 생성이 활발한 반면 성숙된 각질층으로 갈수록 이미 생성된 EGFR 단백을 많이 함유하기 때문으로 생각되어진다.

어떤 연구가들은 정상 치은 상피<sup>26)</sup>와 정상 협점막<sup>3)</sup>에서 EGFR의 발현을 관찰하는데 실패하였다고 보고하였다. 이에 관한 두가지 가정이 있을 수 있다. 첫째, 사용된 항체가 생성된 단백질의 규명에 적합하지 않게 되는 수가 있는데<sup>28)</sup>, 고정 과정 중에 항원의 변성이 있어서 항체가 새 단백질 구조를 인식하지 못하게 되는

수가 있다. 둘째, 방법적인 차이(예컨대 배위자 결합법, post-embedding colloidal gold labelling, 면역조직화학적 염색법 등)로 인하여 나타나는 검출에 대한 역치의 차이<sup>26)</sup>가 여러 연구들 간의 불일치를 설명해 줄 수도 있다.

또 다른 고려 사항은 비록 치은 상피의 염증에 대하여 타액의 EGF의 역할이 명확히 밝혀져 있지는 않지만, 여러 연구들에서 사용한 정상 치은 상피 조직은 타액의 EGF에 영향을 받을 수 있다는 사실이다. 치은 상피란 항시 6-17 ng/ml<sup>9)</sup>의 EGF를 함유하고 있는 타액을 포함한 구강 환경에 노출되어 있으므로 엄밀한 의미에서 진정으로 순수한 정상 치은 상피란 있을 수 없다.

염증성 치은 상피에서의 본 연구의 결과로 볼 때 비록 두 방법에 의한 결과가 약간 다르지만 염증 반응 중에 EGFR의 상향 조절(up-regulation)이 있다는 것을 알 수 있다. 이러한 수용체의 상향 조절에 대한 기전은 충분히 알려져 있지는 않지만 초기 염증 반응 중에 활성화된 macrophage와 lymphocyte로부터 많은 성장 인자들(growth factors)이 유리되기 때문에 짐작되어지고 있다<sup>41)</sup>. 흥미있는 사실은 과도한 음주와 흡연을 하는 사람의 정상 구강 상피에서도 EGFR이 증가된 소견을 보였는데 이러한 증가도 본 연구의 관찰과 유사하게 약물 남용에 의한 만성적인 염증에 의한 것으로 보고되었다<sup>3)</sup>. EGFR의 상향조절은 EGF에 대한 세포 반응의 증가를 가져오고, 이러한 증가된 반응은 adult periodontitis로 인한 염증에 의해 손상 받은 치주 조직을 보존하기 위한 시도로 여겨진다.

치낭 조직에서는 Malassesz 상피 세포 내에 EGFR이 많이 함유되어 있었으며, Thesleff<sup>37)</sup>는 방사선자기법에 의하여 Malassesz 상피 세포 내에 <sup>125</sup>I-labelled EGF가 강하게 결합되어 있는 것을 보고하기도 하였다. Malassesz 상피 세포의 기능은 잘 알려져 있지 않지만 일반적으로 반응성 증식과 분화를 할 수 있는 것으로 여겨지고 있다. Trowbridge와 Shibata<sup>39)</sup>는 쥐의 Malassesz 상피 세포 내에서 활동적인 세포 분열을 관찰하였고, Malassesz 상피 세포의 분열과 활성화가 치근단 낭종(periapical cyst)과 치주 낭종(periodontal cyst)를 일으킨다고 제안하였다<sup>22,37)</sup>. 낭종의 형성 중에 정상적으로는 활동성이 없이 존재하던 Malassesz 상피 세포가 증식과 분화를 하도록 자극을 받게된다. 이 자극의 기전은 밝혀져 있지 않으나 염증과 여러 종류의 면역 세포의 국소적인 침착에 의

한 것으로 보고되었다<sup>18)</sup>. Brunette<sup>6,7)</sup>(1984 a,b)은 세포 배양 연구를 통하여 기계적인 세포의 인장과 cyclic AMP의 세포 내 증가가 Malassesz 상피 세포의 증식을 촉진한다고 하였다.

치낭 조직에서 본 연구는 Malassesz 상피 세포 내에 다량의 EGFR이 존재하는 것을 보여주었으나, 이 사실이 EGFR의 양과 Malassesz 상피 세포의 증식이나 낭종의 형성에 관계된다는 것을 의미하는 것은 아니다. 왜냐하면 본 연구에서 택한 치낭 조직은 병적인 상태가 아닌 정상 상태에 있었으며 또한 타액의 오염도 없었기 때문이다. 정상 상태의 치낭 조직 내에 있는 다량의 EGFR의 역할은 알려져 있지 않으나 치낭 조직 내의 Malassesz 상피 세포의 현재의 항상성을 유지하기 위한 것으로 보인다. 낭종의 형성과 같은 병적인 상태에서는 EGFR이 EGF의 활동에 반응하여 치낭 조직과 그 주위 조직을 보존하기 위해 반응하는 것으로 보인다.

이상의 결과에서 볼 때, 염증성 치은 상피에서 EGFR의 과발현과 치낭 조직의 Malassez 상피세포 잔존물에서 다량의 EGFR이 존재하는 것으로 미루어, 이는구강 환경에 가해질 수 있는 손상에 대하여 생체의 항상성을 유지하기 위한 반응으로 여겨진다.

## V. 결 론

동소 mRNA 보합결합법과 면역조직 화학적 염색법을 이용하여 정상 치은 상피와 염증성 치은 상피의 표피성장인자 수용체의 발현을 관찰하여 치은 상피의 염증에 있어서 표피성장인자 수용체의 역할을 연구하고, 타액에 노출되지 않는 치낭 조직에 있어서 표피성장인자 수용체의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동소 mRNA 보합결합법상 정상 치은 상피에서 EGFR mRNA는 거의 기저세포층에 국한되어 나타났으며, 극세포층은 약양성을 보였고 과립층과 각화층에서는 발현되지 않았다.
2. 면역조직 화학적 염색법상 정상 치은 상피에서 EGFR 단백질은 거의 각화층과 과립층에 국한되어 나타났으며, 극세포층은 약양성을 보였고 기저세포층에서는 발현되지 않았다.
3. 동소 mRNA 보합결합법상 염증성 치은 상피에서 EGFR mRNA는 각화층을 제외한 전층에 걸쳐서 균일하게 분포하였다.

4. 면역조직 화학적 염색법상 염증성 치은 상피에서 EGFR 단백질은 기저세포층에서 각화층에 걸쳐서 균일하게 분포하였다.
5. 치낭 조직에서는 동소 mRNA 보합결합법과 면역조직 화학적 염색법 모두에서 Malassez 상피세포 잔존물에 강하게 염색이 되었고, 그 외의 주위 조직에서는 발현되지 않았다.

이상의 결과에서 볼 때, 염증성 치은 상피에서 EGFR의 과발현과 치낭 조직의 Malassez 상피세포 잔존물에서 다량의 EGFR이 존재하는 것으로 미루어, 이는 구강 환경에 가해질 수 있는 손상에 대하여 생체의 항상성을 유지하기 위한 반응으로 여겨진다.

### 참 고 문 헌

1. 고향미, 박창수, 정상우. 자궁 경부암에서 EGFR 발현에 관한 In Situ mRNA Hybridization 및 면역조직화학적 염색을 이용한 비교연구. 대한병리학회지 1995 : 29 : 343-351
2. Aziz DC. Quantitation of estrogen and progesterone receptors by immunocytochemical and image analyses. Am J Clin Pathol 1992 : 98 : 105-111.
3. Bergler W, Bier H, Ganzer U. The expression of epidermal growth factor receptors in the oral mucosa of patients with oral cancer. Arch Otorhinolaryngol 1989 : 246 : 121-125.
4. Brigati DJ, Budgeon LR, Unger ER et al. Immunocytochemistry is automated : Development of a robotic workstation based upon the capillary action principle. J Histotechnol 1988 : 11 : 165-183.
5. Brown GL, Nanney LB, Griffen J et al. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. N Engl J Med 1989 : 321 : 76-79.
6. Brunette DM. Cholera toxin and dibutyl cyclic-AMP stimulate the growth of epithelial cells derived from epithelial rests from porcine periodontal ligament. Archs Oral Biol 1984 : 29 : 303-309.
7. Brunette DM. Mechanical stretching increases the number of epithelial cells synthesizing DNA in culture. J Cell Sci 1984 : 69 : 35-45.
8. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. Ann Rev Biochem 1987 : 56 : 881-914.
9. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. Ann Rev Biochem 1979 : 48 : 193-216.
10. Carpenter G, Cohen S. <sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor : Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. J Cell Biol 1976 : 71 : 159-171.
11. Cho M-I, Lee YL, Garant PR. Radioautographic demonstration of receptors for epidermal growth factor in various cells of the oral cavity. Anat Rec 1988 : 222 : 191-200.
12. Christensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL et al. Epidermal growth factor receptor expression on oral mucosa dysplastic epithelia and squamous cell carcinomas. Eur Arch Otorhinolaryngol 1992 : 249 : 243-247.
13. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. J Biol Chem 1962 : 237 : 1555-1562.
14. Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein. Dev Biol 1965 : 12 : 394-407.
15. Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T. Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. Cell 1982 : 31 : 263-273.
16. Damjanov I, Mildner B, Knowles B. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. Lab Invest 1986 : 55 : 588-592.
17. Downward J, Parker P, Waterfield MD. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. Nature 1984 : 311 : 483-485.
18. Gao Z, Mackenzie IC, Williams DM et al. Patterns of keratin expression in rests of Malassez and periapical lesions. J Oral Pathol 1988 : 17 : 178-185.
19. Gerdin E, Juhlin C, Malmgren M, Gerdin B. Immunohistochemical identification of receptors for epidermal growth factor in tumor endothelium may be affected by cross-reactivity to blood group A antigen. Am J Clin Pathol 1993 : 99 : 28-31.
20. Green MR, Basketter, DA, Couchman, JR, Rees DA. Distribution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. Dev Biol 1983 : 100 : 506-512.
21. Gusterson B, Cowley G, Smith JA, Ozanne B. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. Cell Biol Int Rep 1984 : 8 : 649-658.
22. Harris M, Toller P. The pathogenesis of dental cysts. Br Med Bull 1975 : 31 : 159-163.
23. Henzen-Logmans SC, Berns EMJJ, Klijn JGM, van der Burg MEL, Foekens JA. Epidermal growth factor receptor in ovarian tumors : correlation of immunohistochemistry with ligand binding assay. Br J Cancer 1992 : 66 : 1015-1021.
24. Iezzoni JC, Kang J-H, Bucana CD, Reed JA, Brigati DJ. Rapid colorimetric detection of epidermal growth factor receptor mRNA by in situ hybridization. J Clin Lab Analysis 1993 : 7 : 247-251.
25. Iezzoni JC, Kang J-H, Montone KT, Reed JA, Brigati DJ. Colorimetric detection of herpes simplex virus by DNA in situ sandwich hybridization : A rapid, formamide-free, random oligomer-enhanced method. Nucleic Acids Res 1992 : 20 : 1149-1150.
26. Irwin CR, Schor SL, Ferguson MWJ. Expression of EGF-receptors on epithelial and stromal cells of normal and

- inflamed gingiva. *J Periodont Res* 1991 : 26 : 388-394.
27. Maiorano E, Favja GF, Bufo P. Epidermal growth factor receptor expression in squamous papillomas of the oral mucosa. *Boll Soc It Biol Sper* 1993 : 69 : 195-202.
  28. Montone KT, Tomaszewski JE. In situ hybridization for epidermal growth factor receptor(EGFR) external domain transcripts in prostatic adenocarcinoma. *J Clin Lab Analysis* 1993 : 7 : 188-195.
  29. Nakagawa S, Pawelek P, Grinnell F. Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness. *Exp Cell Res* 1989 : 182 : 572-582.
  30. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease : A summary of current work. *Lab Invest* 1976 : 33 : 235-249.
  31. Partanen A-M, Thesleff I. Localization and quantitation of <sup>125</sup>I-epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Dev Biol* 1987 : 120 : 186-197.
  32. Partridge M, Gullick WJ, Langdon JD, Sherriff M. Expression of epidermal growth factor receptor on oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988 : 26 : 381-389.
  33. Radinsky R, Bucana CD, Ellis LM et al. A rapid colorimetric in situ messenger RNA hybridization technique for analysis of epidermal growth factor receptor in paraffin-embedded surgical specimens of human colon carcinoma. *Cancer Res* 1993 : 53 : 937-943.
  34. Reed JA, Manahan LJ, Park C-S, Brigati DJ. Complete one-hour immunocytochemistry based on capillary action. *Biotechniques* 1992 : 13 : 434-443.
  35. Shaw PAV, Pringle JH. The demonstration of a subset of carcinoid tumors of the appendix by in situ hybridization using synthetic probes to proglucagon mRNA. *J Pathol* 1992 : 167 : 375-380.
  36. Steidler NE, Reade PC. Histomorphological effects of epidermal growth factor on skin and oral mucosa in neonatal mice. *Archs Oral Biol* 1980 : 25 : 37-43.
  37. Thesleff I. Epithelial cell rests of Malassez bind epidermal growth factor intensely. *J Periodont Res* 1987 : 22 : 419-421.
  38. Thesleff I, Partanen A-M, Rihniemi L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. *Eur J Orthod* 1987 : 9 : 24-32.
  39. Trowbridge HO, Shibata F. Mitotic activity in epithelial rests of Malassez. *Periodontics* 1967 : 5 : 109-112.
  40. Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984 : 309 : 418-425.
  41. Wahl SM, Wong H, McCartney-Francis N. Role of growth factors in inflammation and repair. *J Cell Biochem* 1989 : 40 : 193-199.
  42. Yamada K, Iwai K, Okada Y, Mori M. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in salivary gland tumors. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1989 : 415 : 523-531.

- ABSTRACT -

## Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in the Inflamed Gingival Epithelium and the Dental Follicle

Young Ho Kim, D D S . M S . Ph D., Chang Bae, D D.S . M.S . Ph D

*Division of Orthodontics, Department of Dentistry, Catholic University Medical College*

Epidermal growth factor(EGF), a single chain polypeptide of 53 amino acids with a molecular weight of 6,045 Da, was first isolated from the male mouse submandibular glands. EGF stimulates cellular proliferation and differentiation in several tissues and accelerates the rate of wound healing. EGF is bound to the specific receptor(EGFR) on the cell membrane of its target cell. EGFR is a transmembrane glycoprotein with a molecular weight of 170,000 Da and is detectable on a large variety of cell types and tissues.



The authors investigated the expression of EGFR in the normal and inflamed human gingival epithelium to study the role of EGFR in the inflammation of the gingival epithelium, and the expression of EGFR in the dental follicle by using in situ mRNA hybridization and immunohistochemistry. The results were as follows ;

1. The expression of EGFR mRNA in the normal gingival epithelium on in situ mRNA hybridization was mainly localized on the basal cell layer, and the spinous layer was weakly positive. The granular and cornified layers were negative.
2. The expression of EGFR protein in the normal gingival epithelium on immunohistochemistry was localized on the cornified and granular layers, and the spinous layer was weakly positive. The basal cell layer was completely negative.
3. The expression of EGFR mRNA in the inflamed gingival epithelium on in situ mRNA hybridization was evenly and homogeneously distributed in the whole layers of the gingival epithelium except the cornified layer. The staining intensity appeared to increase progressively from the basal cell layer to the cornified layer.
4. The expression of EGFR protein in the inflamed gingival epithelium on immunohistochemistry was evenly and homogeneously distributed in the whole layers of the gingival epithelium. The staining intensity appeared to increase progressively from the cornified layer to the basal cell layer.
5. Strong positive reaction was seen in the epithelial cell rests of Malassez, whereas only background staining was seen in other cells of the dental follicle.

In conclusion, the up-regulation of EGFR in the inflamed gingival epithelium and the high amounts of EGFR in the epithelial cell rests of Malassez in the dental follicle can be regarded as responses to the possible damages to the oral environment to maintain the homeostatic conditions.

KOREA. J. ORTHOD. 1997 ; 27 : 349-357

※ **Key words** : Epidermal growth factor receptor(EGFR), gingival epithelium, dental follicle, in situ mRNA hybridization, Immunohistochemistry