

발생중인 흰쥐 치아에서 RANKL과 OPG의 발현에 대한 면역조직화학적 연구

김민석, 김현진, 김일섭, 김선현
전남대학교 치의학전문대학원 치의학연구소

간추림 : 뼈 흡수를 위해서 뼈파괴세포의 분화와 활성화는 필수적이며 뼈모세포나 주변 버팀질세포가 분비하는 뼈파괴세포 분화인자(osteoclast differentiation factor: ODF)로 알려진 receptor activator of nuclear κ B ligand (RANKL)와 그것의 유인성 수용체로 뼈파괴세포 분화를 억제하는 osteoprotegerin (OPG)/osteoclast inhibitory factor (OCIF)와 같은 단백질이 중요한 역할을 한다. 맹출 전 후 턱뼈 내에서 다양한 이동 양상을 갖게 되는 치아는 필연적으로 주변 뼈의 흡수를 동반한다. 본 연구는 발생중인 치아 주변에서 뼈파괴세포의 분화와 활성화에 관계되는 여러 인자를 구명하기 위하여 시행되었다. 실험동물은 생후 1일에서 24일까지의 흰쥐를 사용하였고 발생중인 치아를 포함하는 턱뼈 내에서 RANKL과 OPG의 분포를 면역조직화학적 방법을 이용하여 분석하였다.

출생 후 맹출 전 흰쥐 아래턱 첫째, 둘째 큰어금니는 중시기부터 치관기에 이르는 치아씩 형태를 보였다. 생후 17일째 아래턱 첫째 큰어금니는 치관 형성이 완성되고 치근 형성과 함께 지속적인 맹출이 진행되고 있었으며, 생후 24일째 구강내로 노출되었다. RANKL은 아래턱 큰어금니를 둘러싸고 있는 치낭과 주변의 이틀뼈 버팀질세포에서 강한 면역화학적 양성 반응을 보였다. 생후 3일째 아래턱 첫째 큰어금니 상부 이틀뼈에 다수의 뼈파괴세포 출현과 함께 RANKL에 대한 강한 양성반응이 관찰되었고, 생후 7일째에 약간 감소하였다가 생후 10일째 다시 증가하는 양상이 관찰되었다. 발생중인 치아의 상부 이틀뼈 뿐 아니라 치아목부위에 존재하는 Hertwig 상피 치근 집과 인접한 이틀뼈 버팀질세포에서도 RANKL에 대한 면역화학적 양성반응이 관찰되었고, 특히 발생중인 치근의 하방 이틀뼈에서 강한 염색성을 나타내었다. OPG는 RANKL의 발현과 양성 반응을 보이는 세포들의 위치에 있어 거의 유사한 양상을 보였으나 시기적으로 다수의 뼈파괴세포가 출현하는 생후 3일과 10일째 치아 주변에서는 상대적으로 약한 염색성을 나타내었다.

이상의 결과는 RANKL과 OPG가 치아 발생과정 동안 맹출을 비롯한 턱뼈 내 치아 이동과 밀접한 관련이 있으며, 치낭과 이틀뼈 버팀질세포에서 합성되어 뼈파괴세포 형성에 중요한 역할을 수행함을 시사하였다.

찾아보기 낱말 : 치아 발생, RANKL, OPG, 면역조직화학

서 론

뼈파괴세포 분화 인자 (Osteoclast differentiation factor: ODF)는 receptor activator of nuclear κ B ligand (RANKL)라고도 하는 종양 괴사 인자군 (tumor necrosis factor superfamily: TNF)의 세포막 결합성 · 용해성 물질이다. 이 물질은 뼈모세포나 버팀질세포에

교신저자: 김선현(전남대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실)
전자우편: ksh@chonnam.ac.kr

서 발현되어 뼈파괴세포 전구세포의 RANK 수용체에 결합하여 뼈파괴세포의 분화, 생존, 활성화 등 뼈파괴세포 형성의 전 과정에 참여한다(Lacey 등 1998, Quinn 등 1998, Yasuda 등 1998). 뼈파괴세포 형성 억제 인자(Osteoclastogenesis inhibitory factor: OCIF)는 osteoprotegerin (OPG)이라고도 하는 종양 괴사 인자 수용체군의 분비성 물질로, RANKL의 유인성 수용체(decoy receptor)로 작용하여 RANK와 상호작용을 방해함으로써 뼈파괴세포 형성과 활성을 억제

한다(Simonet 등 1997, Lacey 등 1998, Yasuda 등 1998). 따라서 RANKL와 OPG는 뼈파괴세포의 형성과 활성화에 관여하는 필수적인 조절자로 작용한다(Simonet 등 1997, Yasuda 등 1998).

치아 발생은 발생 중에 있는 턱뼈 속에서, 즉 구강상피로부터 멀리 떨어져 있는 뼈음와(alveolar crypt) 속에서 일어난다. 발생 초기단계에 있는 유치의 치아뿌는 그 크기가 매우 작으므로 발생 중인 턱뼈 내에서 충분한 공간을 확보할 수 있지만 치아뿌가 빠르게 성장하면서 공간이 부족하게 된다. 또한 턱뼈 성장과 함께 후방, 외상방 혹은 외하방으로 치아뿌 이동이 일어나게 된다. 특히, 치근 형성 시작 직후에 치아는 그 교합면이 교합평면에 이르는 구강 내의 최종 위치에 도달할 때까지 맹출을 계속하게 된다. 이와 같이 턱뼈 내에서 일어나는 치아뿌의 다양한 움직임을 위해서는 치아뿌 주위 뼈조직의 형성과 흡수가 필수적이다(Ten Cate 1994). 따라서 발생 중인 치아 주위 뼈의 흡수를 담당하는 세포인 뼈파괴세포의 세포 역동성을 조절하는 인자를 구명함은 의미 있는 일이라 하겠다. 최근 기능 중인 흰쥐 치아 주위 조직과 사람 유치 치근의 생리적 흡수 동안 치주인대 세포에서 RANKL/ODF 발현이 뼈파괴세포의 유도과 관련이 있음이 보고되었다(Kawamoto 등 2002, Fukushima 등 2003). 그러나 발생 중인 치아를 포함하고 있는 치아뿌 주변에서 있을 RANKL/ODF와 OPG/OCIF 분포에 관한 연구는 드물다.

본 연구는 발생 중인 치아를 포함하고 있는 흰쥐 턱뼈에서 시기에 따른 RANKL와 OPG의 발현 변화를 면역조직화학적 방법을 통해 관찰하여 치아의 비맹출성 이동과 맹출성 이동의 기전을 구명코자 시행하였다.

재료 및 방법

실험 동물은 Sprague-Dawley 흰쥐 24마리를 암수 구분 없이 사용하였다. 생후 1, 3, 7, 10, 17, 24일에 4마리씩 Pentobarbital sodium (50 mg/kg, ip) 마취하에 발생 중인 치아를 포함한 위턱뼈과 아래턱뼈를

절취하여 4% paraformaldehyde (4°C, pH 7.4) 용액에 24시간 침윤고정하고 10% EDTA (4°C, pH 7.4) 용액에서 2~4주간 탈회하였다. PBS로 세척하고 에탄올 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 파라핀에 포매한 조직은 회전식 절편기로 5µm 연속 절편을 얻어 H-E 염색 후 광학현미경으로 발생 중인 치아와 치낭, 맹출 중인 치아 주변의 이틀뼈 내에 존재하는 뼈파괴세포의 형태적 특징을 관찰하였다. 이후 면역조직화염색을 시행하였으며, 일차항체로 purified monoclonal mouse anti-RANKL과 purified monoclonal mouse anti-OPG (Santa Cruz Lab. USA)를 사용하였다.

면역조직화학 염색은 Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하였다. Xylene으로 탈 파라핀 과정을 거친 절편을 내재성 peroxidase 활성을 제거하기 위해 60% methanol에 희석한 3% H₂O₂에 1시간 반응시킨 다음 PBS 완충액으로 세척하고 10% 말 혈청에서 1시간 배양하여 주변부의 비특이적 반응을 억제하였으며, 0.3% bovine serum albumin이 함유된 PBS에 1차 항체를 각각 1:50으로 희석하여 4°C에서 14~16시간 반응시켰다. 이때 대조염색은 일차항체 대신 정상 말 혈청을 사용하였다. 반응시킨 조직은 PBS로 세척하고 2차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG가 든 용액에 30분간 위치시킨 후 avidin, biotinylated horseradish peroxidase reagent에 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 절편은 PBS로 세척 후 AEC로 10분간 발색하고 Meyer's Hematoxyline으로 대조 염색 후, 탈수과정을 거쳐 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. H-E 염색 소견

출생 후 맹출 전 흰쥐 아래턱 첫째, 둘째 큰어금니는 중시기부터 치관기에 이르는 치아뿌 형태를 보였다. 생후 1 일째 흰쥐 아래턱 첫째 큰어금니의 치아뿌는 중시기의 형태를 보이고 있었으며 생후 3 일째 아래턱 첫째 큰어금니는 치관부 상아질과 법

랑질의 합성이 시멘트질법랑질이음부까지 진행되고 있는 전형적인 치관기의 소견을 보였다. 미래의 치관 치근 이음부 하방에서는 치근부 상아질 형성을 위한 두층의 상피세포로 된 Hertwig 상피 치근집 (HERS)을 관찰할 수 있었으며, 다근치 형성을 위한 상피격막의 형성이 시작되었다(Fig. 1). 생후 17 일째 아래턱 첫째 큰어금니는 치관 형성이 완성되고 치근 형성과 함께 계속적인 맹출을 진행하고 있었으며, 맹출 중인 치아쌍을 덮고 있는 이틀뼈 두께가 현저하게 감소하였다(Fig. 2). 생후 24 일째 맹출중인 치관은 인접 접합상피의 형성과 함께 구강내로 노출되었다(Fig. 3). 둘째 큰어금니는 첫째 큰어금니에 비해 시기적으로 발생정도가 낮았다. 발생중인 치아쌍을 둘러싸고 있는 이틀뼈는 다수 뼈파괴세포 출현과 함께 지속적인 뼈흡수가 진행되고 있었으며, 치아쌍 상부 뿐 아니라 치근 하방의 이틀뼈에서도 다수의 뼈파괴세포를 관찰할 수 있었다. 뼈파괴세포는 생후 3 일째 발생중인 치아 주변의 이틀뼈에서 다수 출현하였고, 7 일째는 감소했다가 생후 10 일째 다시 증가하는 양상을 보였다(Figs. 4, 5).

2. RANKL 면역염색 소견

RANKL에 대한 면역조직화학적 염색 결과, 아래턱 큰어금니를 둘러싸고 있는 치낭과 주변의 이틀뼈 버팀질 세포에서 강한 양성 반응을 관찰하였다. 생후 3 일째 아래턱 첫째 큰어금니 상부 이틀뼈 주변에서 RANKL에 대한 강한 양성 반응을 관찰하였고, 생후 7 일째에 약간 감소하였다가 생후 10 일째 다시 증가하였다. 이는 치아쌍 주변의 이틀뼈 흡수를 위해 출현하는 뼈파괴세포 수의 변화와 유사한 양상으로 진행되었다(Figs. 5~8). 발생중인 치아의 상부 이틀뼈 뿐 아니라 치근 형성을 유도하는 HERS와 인접한 이틀뼈 버팀질세포에서도 RANKL에 대한 면역화학적 양성 반응이 관찰되었고 특히 발생중인 치근의 하방 이틀뼈에서도 다수의 뼈파괴세포 출현과 함께 강한 염색성을 나타내었다(Figs. 9, 10).

3. OPG 면역 염색소견

OPG에 대한 면역조직화학적 염색 소견은 RA-

NKL의 발현과 유사하게 치아쌍을 둘러싸고 있는 치낭과 이틀뼈에서 양성 반응을 보였으나 시기적으로 RANKL에 대한 염색성이 미약했던 생후 7 일째 상대적으로 강한 염색성을 보인 반면 다수의 뼈파괴세포가 출현하는 생후 3 일과 10 일째 치아 주변에서는 반응성이 감소하였다(Figs. 11~13).

고 찰

치낭은 발생중인 치아쌍 전체를 둘러싸는 소성 결합조직으로 치아쌍목고리(cervical loop) 부위에서 치유두로 이어져 있다. 이 치낭의 세포들이 치아 발생 과정 중 시멘트질모세포, 섬유모세포, 뼈모세포 등으로 분화하여 각각 시멘트질, 치주인대, 이틀뼈 등의 치주 조직을 형성한다. 치낭을 외과적으로 절제한 경우 치아가 맹출할 수 없음이 보고되었고(Cahill과 Marks 1980), colony stimulating factor-1(CSF-1), *c-Fos*, transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), interleukin-1 α (IL-1 α), monocyte chemotactic protein-1(MCP-1), vascular endothelial growth factor(VEGF) 등 다양한 분자적인 신호들이 치낭에서 생기므로(Wise와 Lin 1995, Wise 등 1999) 치낭은 맹출과 같은 턱뼈 내 치아쌍 이동을 조절하는데 중요한 구실을 하는 것으로 여기고 있다. 치낭에서 발현하는 많은 맹출 관련 인자들은 주변 이틀뼈의 흡수와 관련한 물질들이며, 본 연구에서 검출한 RANKL과 OPG 역시 뼈파괴세포의 분화와 활성을 조절하는 가장 중요한 물질들 중의 일부이다. 따라서 치낭은 RANKL과 OPG 등의 합성, 분비를 통해 발생중인 치아쌍 주변 이틀뼈를 개조할 수 있는 조절자로 작용할 수 있는 가장 강력한 세포군으로 가정할 수 있다(Wise 등 2002).

본 연구에서 발생중인 아래턱 첫째 큰어금니를 포함하고 있는 치아 주변에 인접한 뼈음와내에 나타나는 뼈파괴세포의 수는 시기에 따라 차이를 보였다. 즉 생후 3 일째 많은 수의 뼈파괴세포가 출현하였고 이후 7 일째 소견에서는 감소하였다가 생후 10 일째 다시 증가하는 양상을 보였다. 이는 설치류 아래턱 첫째 큰어금니의 맹출과 관련하여 뼈파괴세

포의 수가 생후 3 일째 최고치에 이르고 이후 점점 줄어들다 생후 10 일째 두 번째 정점을 보인다는 이전 연구 결과들과 일치하는 것이다 (Wise와 Fan 1989, Wise와 Yao 2003). 생후 3 일째 아래턱 첫째 큰어금니는 법랑질이나 상아질 등의 치아를 구성하는 조직들의 형성이 진행 중이며, 첫째 큰어금니의 외형이 완성될 때까지 지속적인 치아썩 크기의 증가를 위한 주변 이틀뼈의 활발한 흡수를 필요로 한다는 관점에서 설명할 수 있겠다. 본 연구에서 생후 3 일째, 많은 수의 뼈파괴세포가 치아썩을 덮고 있는 상방의 이틀뼈 뿐만 아니라 치아썩목고리 부위 주변의 이틀뼈나 활발한 치근의 형성이 진행되고 있는 치아썩 하방의 이틀뼈에서도 관찰되었는데, 이는 치아 형성이 진행되는 동안 주변 이틀뼈의 개조가 동반되어야 함을 의미하는 것이라 하겠다. 본 연구에서 생후 7 일째 뼈파괴세포 수의 감소가 뚜렷하였는데, 이는 아래턱 첫째 큰어금니 치아썩 주변의 치낭 세포가 치주인대세포로 분화하여 인접 이틀뼈에 부착이 일어나야 하므로 제한적인 뼈파괴세포의 활성화만을 필요로 함을 시사하는 소견이었다. 감소했던 뼈파괴세포는 생후 10 일째 다시 증가하였는데, 이는 이 시기에 치아는 활발한 치근 형성과 함께 맹출되며 이를 위해 치아썩 상방의 이틀뼈 부위에 다수의 뼈파괴세포가 출현하는 것으로 보인다.

이와 같은 뼈파괴세포 수의 시기에 따른 증감은 뼈파괴세포의 분화와 활성을 조절하는 RANKL과 OPG의 발현 양상과 관련 있는 것으로 보인다. 즉, RANKL은 다수의 뼈파괴세포가 출현하는 생후 3 일과 10 일째 치아주머니와 주변 이틀뼈의 버팀질세포에서 강한 양성반응을 보였고, 생후 7 일째는 염색성이 감소하였다. 또한 OPG는 RANKL과 반대로 생후 7 일째 강한 염색성을, 생후 3, 10 일째는 상대적으로 약한 양성 반응이 관찰되었다. 이는 발생중인 치아썩 주변의 뼈 흡수를 위해 출현하는 뼈파괴세포의 분화, 활성이 RANKL에 의해 증가하고 OPG에 의해 감소함을 보여주는 직접적인 증거라 할 수 있겠다. 최근 Yao (2004) 등은 레이저 미세절제술을 이용하여 흰쥐의 치낭을 분리하고 RANKL의 존재를 확인하였으며, 치낭에서 합성, 분비하는 것으로 알려진 인자들 중 CSF-1이나 VEGF처럼 뼈파괴세

포 분화와 관련있는 몇몇 인자들의 발현 양상 역시 RANKL의 것과 유사하였다 (Wise와 Yao 2003). RANKL과 OPG는 발생중인 치아에서 뿐 아니라 정상적인 사람과 설치류의 치주인대 세포에서 합성하고 분비한다 (Sakata 등 1999, Wada 등 2001, Kawamoto 등 2002). 따라서 RANKL과 OPG는 치아 맹출 뿐 아니라 치주인대의 유지를 위한 이틀뼈의 개조에도 중요한 역할을 하는 것으로 생각한다.

최근 상아모세포와 치수 세포를 비장 세포와 함께 배양한 실험에서 RANKL과 OPG의 발현을 확인하였고 (Rani와 MacDougall 2000), 발생중인 설치류의 치아기관에서도 RANKL과 OPG의 존재를 유전자 수준에서 검출하였다 (Ohazama 등 2004). 이런 결과들로 보아 치아와 관련된 세포들 중 치낭 세포가 뼈파괴세포 분화를 조절하는 유일한 세포들은 아닌 것 같다. 본 연구는 치낭과 주변 이틀뼈 버팀질 세포에서 RANKL과 OPG 발현을 단백질 수준에서 확인한 것이므로 이전 연구결과들과 차이가 있을 수 있으며, 이는 생체에서 치낭과 이틀뼈 버팀질세포들을 제외한 다른 세포들에서는 그 발현량이 너무 작아 면역조직화학적 반응으로는 검출할 수 없었기 때문으로 생각한다. 따라서 보다 정확한 RANKL과 OPG의 발현 부위와 시기를 확인하기 위해서는 *in situ* hybridization, RT-PCR과 northern blot 등 다른 방법을 이용한 유전자 수준의 연구가 계속되어야 할 것으로 보인다. 또한 치아의 맹출 전 후 턱뼈내 이동 기전을 밝히기 위해 치낭세포의 분리, 배양을 통한 생체의 실험을 통해 뼈파괴세포 분화와 활성을 조절하는 새로운 조절 물질의 탐색이 이어져야 할 것으로 생각한다.

참고 문헌

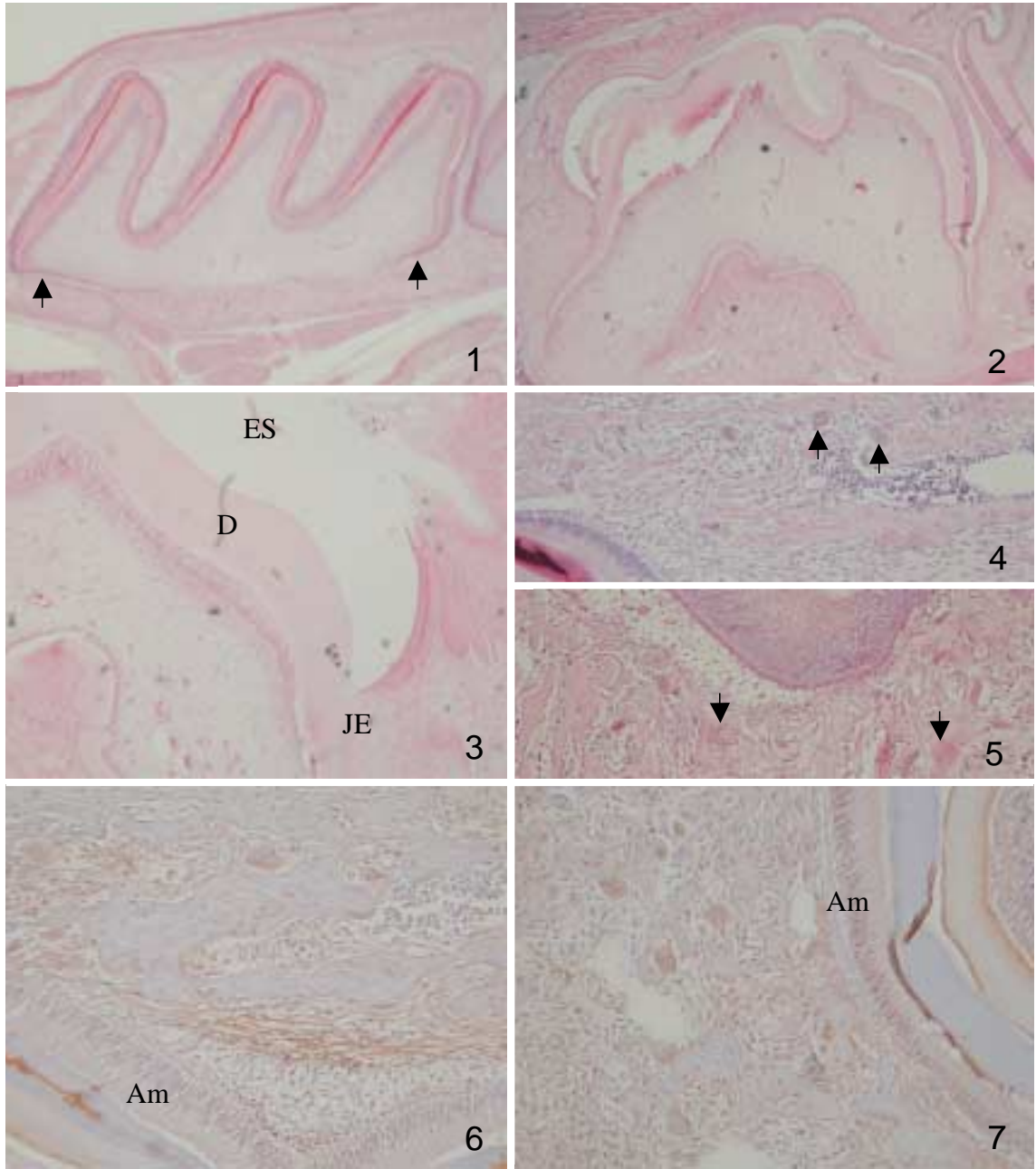
- Cahill DR, Marks SC Jr : Tooth eruption : evidence for the central role of the dental follicle. J Oral Pathol 9: 189-200, 1980.
- Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K : Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. Eur J Oral Sci 11: 346-352, 2003.

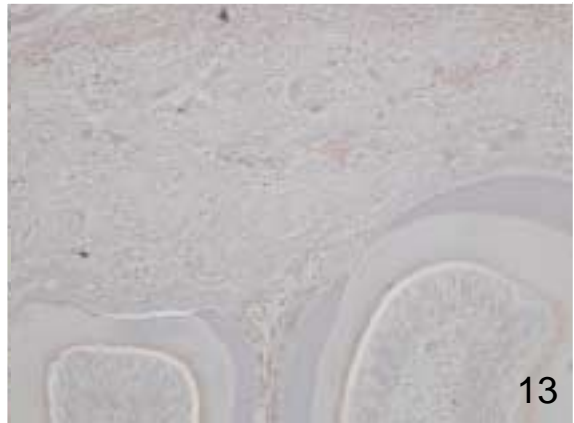
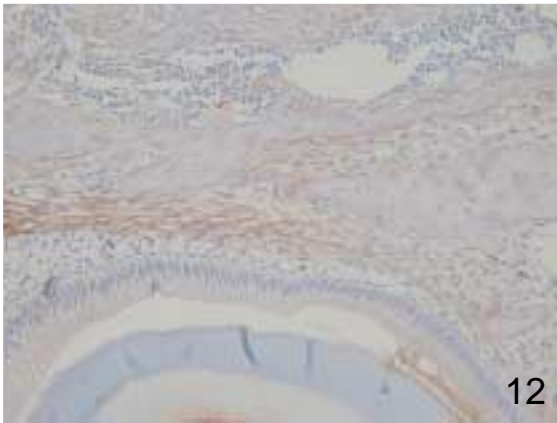
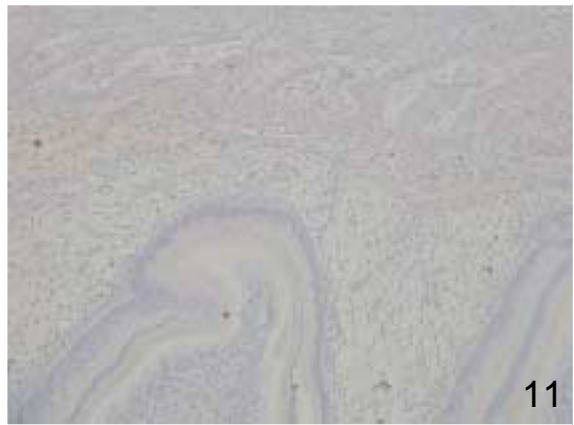
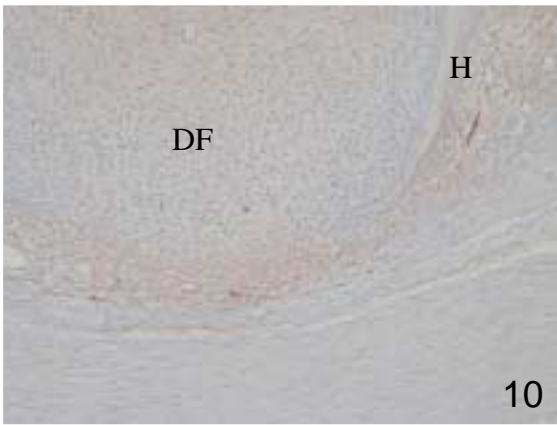
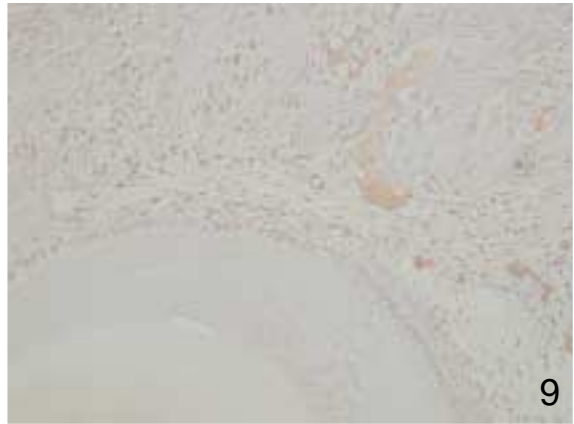
- Kawamoto S, Ejiri S, Hoshi K, Nagaoka E, Ozawa H : Immunolocalization of osteoclast differentiation factor in rat periodontium. *Arch Oral Bio* 47: 55-58, 2002
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ : Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93: 165-176, 1998.
- Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT : Opg, Rank, and Rankl in tooth development : co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res* 83: 241-244, 2004 .
- Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ : A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation *in vitro*. *Endocrinology* 139: 4424-4427, 1998.
- Rani CS, MacDougall M : Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun* 3: 145-152, 2000.
- Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H, Kurihara H : Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 14: 1486-1492, 1999.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ : Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-319, 1997.
- Ten Cate AR : Development of the tooth and its supporting tissues. In : (ed) *Oral histology : development, structure and function* (6th ed : Ten Cate). Mosby Year Book, St Louis, pp 58-80, 1994.
- Wada N, Maeda H, Tanabe K, Tsuda E, Yano K, Nakamura H, Akamine A : Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Periodontal Res* 36: 56-63, 2001.
- Wise GE, Fan W : Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res* 68: 150-156, 1989.
- Wise GE, Lin F : The molecular biology of initiation of tooth eruption. *J Dent Res* 74: 303-482, 1995.
- Wise GE, Huang H, Que BG : Gene expression of potential tooth eruption molecules in the dental follicle of the mouse. *Eur J Oral Sci* 107: 482-486, 1999.
- Wise GE, Yao S, Zhang Q, Ren Y : Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin *in vitro* by rat dental follicle cells and its implications for tooth eruption. *Arch Oral Biol* 47: 247-254, 2002.
- Wise GE, Yao S : Expression of vascular endothelial growth factor in the dental follicle. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 13: 173-180, 2003.
- Yao S, Ring S, Henk WG, Wise GE : *In vivo* expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. *Arch Oral Biol* 49: 451-456, 2004.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3597-3602, 1998.

Legend of Figures

- Fig. 1.** The tooth germ of the mandibular first molar at postnatal day 3 shows the crown stage of tooth development. The formation of Hertwig's epithelial root sheath (arrows) for root dentin at cementoamel junction (CEJ) in the future is seen. H-E stain, $\times 40$
- Fig. 2.** Low magnification showing the tooth germ of the mandibular first molar in the postnatal day 17. Root formation is considerably advanced. H-E stain, $\times 40$
- Fig. 3.** Low magnification showing the tooth germ of the mandibular first molar in the postnatal day 24. The tooth crown along with forming junctional epithelium (JE) is exposed in the oral cavity. dentine (D), enamel space (ES) H-E stain, $\times 100$
- Fig. 4.** Higher magnification of Fig. 1 showing appearance of several osteoclasts (arrows) in alveolar bone above the developing tooth germ. ameloblast (Am) H-E stain, $\times 400$
- Fig. 5.** Higher magnification of Fig. 1 showing appearance of several osteoclasts (arrows) in lateral and lower side of alveolar bone surrounding the developing tooth germ. ameloblast (Am) H-E stain, $\times 400$
- Fig. 6.** Immunostaining with antiserum to RANKL in the developing mandibular first molar tooth germ. Strong Immunoreactivities are detected in dental follicular cells and stromal cells in alveolar bone. ameloblast (Am) postnatal day 3, $\times 400$
- Fig. 7.** Immunostaining with antiserum to RANKL in the developing mandibular first molar tooth germ. Strong immunoreactivities are also observed in lateral and lower part of alveolar bone. postnatal day 3, $\times 400$
- Fig. 8.** Dental follicles adjacent to the developing mandibular first molar tooth germ show weak immunoreactivities for RANKL antiserum. postnatal day 7, $\times 400$
- Fig. 9.** Immunoreactivities for RANKL antiserum increased in dental follicles and alveolar bone adjacent to the developing mandibular first molar tooth germ. postnatal day 10, $\times 400$
- Fig. 10.** Strong immunoreactivities with antiserum to RANKL are also observed in the lower part of alveolar bone surrounding developing tooth germ. Hertwig's epithelial root sheath (H), dental follicle (DF) postnatal day 17, $\times 400$
- Fig. 11.** Immunoreactivities for OPG are detected in the same areas compared to those of RANKL, but considerably weak. postnatal day 3, $\times 400$
- Fig. 12.** Immunoreactivities for OPG are increased, compared with those of Fig. 11. postnatal day 7, $\times 400$
- Fig. 13.** OPG antiserum is very weakly stained except for some immunopositivities near the tooth germ. postnatal day 10, $\times 400$

— 발생중인 치아에서 RANKL과 OPG의 발현 변화 —





Abstract

Expression of RANKL and OPG in the Developing Teeth of the Postnatal Rat

Min-Seok Kim, Hyun-Jin Kim, Il-Sup Kim, Sun-Hun Kim

Dental Science Research Institute College of Dentistry, Chonnam National University

Differentiation and activation of osteoclasts are crucial in bone resorption. RANKL released from osteoblasts, also known as ODF, and proteins such as OPG/OCIF, decoy receptor of RANKL for inhibition of osteoclast formation play an important role. Teeth exhibit various movement patterns in mandible before eruption, inevitably accompanying peripheral bone resorption. Therefore, it is very meaningful to study osteoclasts differentiation and activation-related various factors near developing teeth for prediction of tooth movement patterns and understanding of mechanism of pre- and post-eruptive movement.

This study examined distribution of RANKL and OPG in the mandible of postnatal 1 ~ 24 day rats containing developing teeth using immunohistochemical methods.

After birth, the mandibular pre-eruptive first and second molars showed tooth germ morphology from bell stage to crown stage. In postnatal day 17, the mandibular first molar crown was completed and continuous eruption was in process along with root formation. On the twenty fourth day after birth, it was exposed to the oral cavity. RANKL exhibited strong positive immunohistochemical reactions in dental follicles and stromal cells around the mandibular first molar. On the third day after birth, strong positive reaction to RANKL was observed in the alveolar bone above the mandibular first molar along with appearance of numerous osteoclasts. The reactivity was slightly attenuated on the seventh day and increased again on the tenth day after birth. The positive immunoreactivities were found not only in alveolar bone above the developing first molar, but also in stromal cells of the cervical area in contact with HERS. The alveolar bone below developing roots was also strongly stained. OPG displayed a similar patterns in the RANKL expression and locations of positively reacting cells, but relatively weakly stained on the third and tenth day after birth, when numerous osteoclasts made their appearance.

Above results suggest that RANKL and OPG have a close relation to the teeth movement in mandible such as eruption during teeth developing process. They also imply that RANKL and OPG play an important role in osteoclasts formation after synthesized in dental follicular cells and alveolar stromal cells.

Key words : Tooth development, RANKL, OPG, Immunohistochemistry