

## 임신 중 고열이 Hsp70 KO 생쥐의 초기 치아발생에서 FGF-8과 BMP-4의 발현에 미치는 영향

안 동 춘, 김 종 룡<sup>1</sup>, 김 원 규<sup>1</sup>

강원대학교 수의학부대학 수의학과

<sup>1</sup>한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

**간추림** : 치아의 초기발생과정에는 여러 신호전달물질이 치아관에서 발현되어 치아 중간엽을 유도한다. 이러한 여러 물질 중 FGF-8은 초기 치아상피에서 발현하며 BMP-4는 치아상피의 유도에 의해 치아 중간엽에서 발현되어 치아의 형태발생을 조절한다. 한편, 임신 중 고열은 조직 및 기관의 정상발생을 방해하여, 심한 경우 선천성기형을 유발하는 요인의 하나로 인정받고 있다. 임신 중 고열에 노출되는 경우 보호 기전으로서 열충격단백질이 분비되며, 이 중 Hsp 70이 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 유전자 변형기법을 이용하여 제작된 Hsp70 KO 생쥐를 실험동물로 사용하여 치아 초기발생과정에 중요한 역할을 수행하는 FGF-8 와 BMP-4의 발현양상을 면역조직화학법으로 연구하고자 하였다.

실험군은 고열에 노출된 Hsp70 KO 생쥐 태아를, 대조군으로 고열에 노출되지 않은 Hsp70 KO 생쥐 태아를 사용하였다. 실험군은 임신 제8일에 43°C 수조에서 5분간 열충격을 주었고, 대조군에는 아무런 조작도 가하지 않았다. 임신 제13, 15, 17일에 자궁 속의 태아를 적출한 후 머리를 절취하였다. 머리에서 아래턱을 절취하여 통상적인 조직 제작법에 따라 파라핀에 포매한 후 조직표본을 제작하여 FGF-8 및 BMP-4 면역조직화학염색을 시행하고 광학현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

임신 시기에 따른 치아의 발생은 실험군이 대조군보다 지연되어 있었다. 치아의 FGF-8은 대조군의 경우 발생이 진행됨에 따라 치아상피에서 발현이 감소되었지만 실험군에서는 지속적으로 발현하였다. BMP-4는 대조군에서는 상아질모세포로 분화할 치아속질 중간엽세포에서 양성반응이 나타났지만 실험군의 중간엽세포는 반응을 보이지 않았다.

이상의 결과에서 임신 중 고열은 치아관 성장을 억제하고, 치아상피에서 FGF-8의 발현을 지연시키며, 치아속질 내 중간엽세포에서 BMP-4 발현을 저해하여 치아의 정상적인 발생 중 나타나는 상피-중간엽 상호작용을 방해하는 것으로 생각된다.

**찾아보기 낱말** : 고열, 치아초기발생, FGF-4, FGF-8, 면역조직화학염색

### 서 론

치아 발생 첫 징후는 구강상피가 국소적으로 비후하고 신경능선(neural crest) 기원의 중간엽으로 함입하여 치아싹(tooth bud)을 형성하는 것이며, 이를 치아발생 단계의 싹시기(bud stage)라고 한다. 이후

모자시기(cap stage) 및 종시기(bell stage)를 거치는 동안 치아상피(dental epithelium)의 주름(folding)과 급속한 세포증식이 일어나 치아머리(tooth crown)의 모양이 확립된다(Kettunen 등 1998). 생쥐에서 싹시기는 태령 12~13.5일에 해당하며 구강상피가 아래의 농축된 중간엽을 침범하여 U-자 형태의 치아관(dental lamina)을 형성하는 시기이다(Lumsden 1988). 모자시기는 태령 14~15.5일에 해당하고, 종

교신저자: 김원규(한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)  
전자우편: kimwg@hanyang.ac.kr

시기는 태령 16일부터 생후 7일에 해당한다. 모자시기에 일차사기질결절(primary enamel knot)이 출현하여 치아의 형태발달을 위한 여러 가지 신호전달 물질을 발현한다(Vahtokari 등 1996). 중시기 동안 이차사기질결절이 치아도드리(dental cusp)의 끝에서 출현하며(Jernvall 등 1994), 상아질(dentin)을 형성하는 상아질모세포(odontoblast)와 사기질(enamel)을 침착하는 사기질모세포(ameloblast)가 분화한다(Thesleff와 Hurmerinta 1981).

치아는 수정체, 속귀의 신경상피 및 일부 뇌신경의 먼쪽 신경절이 기원판(placode)에서 형성되는 것처럼 치아기원판(dental placode)에서 발생하며(Pip-sa와 Thesleff 2003), 다른 상피 부속기관과 마찬가지로 치아의 발생도 치아상피와 중간엽의 상호작용에 의해 유도되고 조절된다(Thesleff 등 1995). 상피-중간엽 상호작용은 세포증식, 세포자멸사의 억제와 세포외바탕질분자(extracellular matrix molecules), 신호전달분자(signaling molecules) 및 전사인자(transcription factors)와 같은 여러 분자의 발현을 조절한다(Kettunen 등 1998). 이러한 인자들은 치아쪽의 상피세포를 사기질결절로 분화시켜 세포의 증식과 치아목고리(cervical loop)의 형성을 유도하며, 중간엽세포를 치아속질(dental pulp)로 분화시킨다(Thesleff 등 2001).

이러한 여러 가지 신호전달물질 중 fibroblast growth factor (FGF)는 중배엽, 신경외배엽 및 내배엽 기원 세포의 성장과 분화를 촉진하는 성장인자이며(Wilkie 등 1995), 치아상피에서는 FGF-4, -8, -9, -20이 발현되고, 중간엽에서는 FGF-3, -7, -10이 발현하는 것으로 알려져 있다(Kettunen과 Thesleff 1998, Kettunen 등 2000). FGF-8은 창자배형성(gastrulation), 얼굴, 팔다리 및 중추신경계의 발생에 필수적인 인자(Vogel 등 1996, Tucker 등 1999, Sun 등 1999)일 뿐만 아니라 치아 발생의 시작 시점을 조절하고(Tucker 등 1999), 치아발생이 시작되면 외배엽 기원의 치아기원판에서 발현하기 시작하여 태령 13.5일에는 치아쪽의 먼쪽 부위에서만 관찰될 뿐 구강상피에 인접한 부분에서는 관찰되지 않고, 모자시기와 중시기 동안에는 전혀 발현하지 않는 곳으로 알려

져 있어(Kettunen과 Thesleff 1998), FGF-8은 치아의 초기발생에 관여하는 것을 알 수 있다.

Bone morphogenetic protein (BMP)-4는 기관지의 분지, 수정체 발생, 신경상피의 분화, 원시생식세포의 형성과 털 및 깃털의 발생과 같은 다양한 기관발생에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 치아발생에 있어 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Feng 등 2002). BMP-4는 치아의 초기발생 동안 치아상피에서 발현되다가 이후 초기 씹시기에는 치아중간엽에서 발현되고(Chen과 Maas, 1998), 모자시기에는 사기질결절과 치아중간엽에서, 중시기에는 사기질모세포에서 발현된다(Tabata 등, 2002). 즉, 중간엽이 치아발생능력을 나타내면 BMP-4의 발현이동(expression shift)이 일어나고(Ohazama 등, 2005), BMP-4에 의한 사기질결절의 세포자멸사로 인하여 치아도드리(dental cusp)의 형태를 조절한다(Jernvall과 Thesleff, 2000).

한편, 고열이란 정상중심체온(normal core body temperature)보다 적어도 1.5°C 이상 체온이 상승하는 것을 의미하며, 산모의 고열은 실험동물의 여러 가지 선천성 기형을 일으키고, 특히 중추신경계의 기형을 유발하는 물질로 입증되어 있으며, 사람에서도 기형유발인자의 하나로 현재 인정되고 있다. 역학조사에 의하면 임신초기, 특히 임신 12주 이내에 열성질환이나 잦은 사우나에 의해 무뇌증, 수막척수류, 작은안구증(microphthalmos), 뒤통수 뇌탈출증, 얼굴발육불완전 등이 나타나며, 이외에도 심장결손을 포함한 여러 장기에서 선천성기형과 자연유산율 유발한다(Martinez-Frias 등, 2001). 또한 산모의 고열은 발생중인 태아에서 세포사멸을 유발하며(Kim과 Mirkes 2003), 고열에 노출된 Hsp70 KO 생쥐의 태아 중 72.6%에서 선천성 기형을 일으키고, 뇌탈출증, 눈없음증(anophthalmia), 신경세포의 자멸사, 연골속뼈발생의 지연 등을 일으킨다(Kim 2005). Oh와 Kim(2005)은 산모의 고열은 바닥막의 구성요소 중 하나인 fibronectin의 발현을 지연시켜 입천장갈림증을 일으킨다고 하였으며, Yoo 등(2005)은 고열에 노출된 생쥐 태아에서 연골속뼈발생이 지연됨을 관찰하고 이는 FGF-8의 발현이 억제되어 일어난 것이라

고 보고한 바 있다.

이상과 같이 산모의 고열은 여러 장기의 선천성 기형과 성장지연을 유발한다. 그러나 고열에 노출된 실험동물에서 치아의 초기발생에 관한 연구는 부족한 실정이며, 특히 Hsp70 KO 생쥐에서 연구 보고된 것은 Yoo 등(2007)이 아래턱뼈 치아의 초기발생과정을 연구한 예를 제외하고는 거의 없다. 따라서 본 연구자는 치아발생과정 중 치아상피에서 주로 발현되는 FGF-8과 중간엽에서 발현되는 BMP-4가 고열에 노출되면 어떠한 발현양상을 나타내는지 연구하고자 한다. Hsp70 KO 생쥐를 실험군으로 정하고 임신 8일에 열충격을 가하여 태령 13, 15, 17일에 치아의 초기발생과정에 관여하는 FGF-8과 BMP-4 발현의 변화를 면역조직화학염색법을 통하여 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에서는 열충격단백질의 한 종류인 Hsp70을 유전자조작법으로 결손시킨 C57BL/6계 생쥐(Hsp70 Knock-out; Hsp70 KO)의 태아를 사용하였다. Hsp70 KO 생쥐(-/-)는 미국 A & M 대학교의 Dr. Dix로부터 기증받았다. 대조군으로는 열충격을 가하지 않은 Hsp70 KO 태아를, 실험군으로는 열충격을 가한 Hsp70 KO 태아를 사용하였고 임신 제 13, 15, 17일 태아를 각 군당 5마리씩 배당하였다.

### 2. 모체열충격법

암수 생쥐를 저녁에 1:3의 비율로 합사시키고, 다음날 아침 질마개(vaginal plug)가 확인되면 임신 제 0일로 정하였다. 임신 제8일에 모체를 50 mL Falcon tube에 넣고, 43°C의 수조에 담근 후 2개의 탐침(probe)이 장착된 디지털 체온계를 이용하여 탐침 중 하나는 모체의 직장에 삽입하고, 다른 하나는 수조에 담가 열충격 동안 모체의 체온변화를 기록하였다. 수조의 온도를 43°C로 일정하게 유지하면서

모체의 체온이 43°C에 도달하면 5분간 더 지속하였다. 대조군 생쥐와 함께, 실험군은 열충격을 가한 후 저체온증을 방지하기 위하여 물기를 제거한 후 체온이 정상으로 회복될 때까지 37°C의 부양기내에 두었다.

### 3. 태아적출 및 조직표본제작

임신 제13일, 15일 및 17일에 경추탈구법으로 모체를 희생시킨 후 자궁을 절제하고 Hank 용액에서 태아를 적출하였다. 태아의 머리를 절취하여 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde 및 0.1 M phosphate 완충용액으로 제조한 고정액에 2시간 동안 고정한 후 일반적인 조직표본제작법 과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 두께 6µm의 조직절편을 제작하였다.

### 4. 면역조직화학염색법

발생중인 치아에서 발현되는 FGF-8과 BMP-4을 면역조직화학법으로 염색하기 위하여 제작한 슬라이드를 탈파라핀 과정을 거친 후 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 든 메탄올용액에서 내재성 peroxidase를 제거하고 다음과 같은 방법으로 면역조직화학염색을 시행하였다. FGF-8은 3% horse serum으로, BMP-4는 3% rabbit serum으로 각각 37°C에서 50분간 배양한 후 PBS로 세척하였다. 일차항체로 각각 monoclonal anti-FGF-8 antibody (R & D system, USA)와 polyclonal anti-BMP-4 antibody (Santa Cruz, USA)를 사용하였다. 각각의 일차항체를 3% horse serum과 3% rabbit serum이 포함된 PBS에 1:30과 1:40으로 희석하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. 다음날 PBS로 세척한 후 이차항체(biotinylated Ab, Vector)에 30분간 실온에서 반응시키고, avidin biotin peroxidase complex (Vectastain ABC kits, Vector Co.)로 1시간 동안 반응시킨 후 발색을 위한 기질로 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)에 100µL의 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 5분 동안 발색시키고 methyl green으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

이와 같은 동물실험 전 과정은 한양대학교 동물

실험윤리에 따라 수행하였다.

## 결 과

### 1. FGF-8 면역조직화학염색소견

태령 13일 대조군 아래턱뼈 치아는 싹시기이며, 치아관 내부의 세포와 일차사기질결절로 분화할 치아싹 첨부의 세포에서 양성반응을 나타내었다(Fig. 1A). 태령 13일 실험군의 치아는 구강상피가 비후된 치아관 단계로서 대조군에 비하여 발생이 지연되어 있었다(Fig. 1B). 태령 15일 대조군 아래턱뼈 치아는 모자시기 단계이었고, 사기질모세포를 둘러싸는 바닥막에서 양성반응을 나타내었으며, 치아속질 내부의 혈관 내피세포와 치아속질의 중간엽 세포에서 양성반응을 보였다(Fig. 1C). 태령 15일 실험군 치아는 대조군에 비해 발생이 지연되어 싹시기 말기의 형태를 나타내고 있었고, 장차 치아목고리를 이루게 될 부위의 치아상피 일부 세포가 양성반응을 나타내었으며, 치아싹을 둘러싸고 있는 주변의 중간엽세포는 반응하지 않았다(Fig. 1D). 태령 17일 대조군 아래턱뼈 치아는 초기 종시기이며, 사기질모세포의 바닥막에서 약한 양성반응을 나타내었고, 사기질모세포에 인접하여 장차 상아질모세포로 분화할 중간엽세포에서 양성반응을 보였다(Fig. 1E). 태령 17일 실험군 아래턱뼈 치아에서는 사기질모세포의 바닥막이 양성반응을 나타내었고, 치아목고리에 위치한 사기질모세포에서 양성반응을 보였으며, 치아속질의 중간엽세포에서는 반응을 나타내지 않았다(Fig. 1F).

### 2. BMP-4 면역조직화학염색소견

태령 13일 대조군 아래턱뼈 치아는 싹시기이며, 치아상피를 피복하는 바닥막에서 양성반응을 보였고, 치아상피와 그 하방의 중간엽세포에서는 반응을 나타내지 않았다(Fig. 2A). 태령 13일 실험군 치아는 치아관 단계이고, 구강상피와 연속하여 치아상피에서 양성반응을 보이는 다수의 세포가 관찰되었다(Fig. 2B). 태령 15일 대조군 아래턱뼈 치아에서 바

닥막 하방의 장차 상아질모세포로 분화할 중간엽세포에서 양성반응을 나타내었으며(Fig. 2C), 태령 15일 실험군 치아에서 치아상피, 바닥막, 치아속질 내 중간엽세포는 BMP-4에 반응을 보이지 않았다(Fig. 2D). 태령 17일 대조군 치아에서 BMP-4는 치아속질 내 치아상피와 인접한 세포의 대부분이 양성반응을 보였으며(Fig. 2E), 실험군에서는 일부의 치아상피가 양성반응을 보였고, 치아속질 내 중간엽세포는 음성반응을 보였다(Fig. 2F).

## 고 찰

임신초기에 사우나 혹은 열탕의 잦은 이용 및 열성질환과 같은 고열에 노출되면 선천성기형이 유발될 수 있으며(Miller 등 1978), 동물실험을 통하여 고온이 기형을 일으킬 수 있는 기형유발인자임이 입증되었고, 사람에서도 기형유발인자 중의 하나임이 역학조사를 통하여 확인되었다(Martinez-Frias 등 2001). 산모 고열에 의한 태아의 손상 기전에 대해 아직 명확히 밝혀진 것은 없지만 태반의 손상이 원인이 될 수 있다는 보고가 있다(Morishima 등 1975, Arora 등 1979). 또한 기형 유발과 관련된 기전으로 제시되는 것은 세포계획사(programmed cell death)와 유사한 기형유발물질에 의한 세포사(teratogen-induced cell death)이다. 기형유발물질은 cytochrome c의 방출, procaspase-9의 활성화 및 effector caspase의 활성을 유도하는 mitochondrial apoptotic pathway를 통하여 세포사망을 일으킨다(Mirkes 2002). Little 등(2003)은 배양중인 태아에 열충격을 가하면 effector caspase인 caspase-6과 -7이 활성화되어 신경상피세포에서 세포자멸사가 일어난다고 하였다. 고열에 의한 세포자멸사는 세포분열이 활발하고 분화가 왕성하게 일어나는 조직에서 흔히 관찰되며, 그 대표적인 예가 신경외배엽 기원의 중추신경계이다. Kim(2005)은 고열에 노출된 Hsp70 KO 생쥐 태아에서 선천성 기형을 동반하는 비율이 72.6%이었고, 뇌탈출증, 눈없음증, 신경세포의 자멸사 등을 조직학적으로 관찰하고 보고한 바 있다. 산모의 고열

은 중추신경계 이외에도 다른 장기에서도 선천성 기형을 일으킨다. Oh와 Kim (2005)은 산모의 고열은 TGF- $\beta$ 2와 FGF-8의 지속적인 발현과 바닥막의 구성요소 중 하나인 fibronectin의 지연발현을 유발하여 입천장갈림증을 일으킨다고 하였으며, Yoo 등 (2005)은 고열에 노출된 생쥐 태아에서 연골속뼈발생이 지연됨을 관찰하고 이는 FGF-8의 발현이 억제되어 일어난 것이라고 보고한 바 있다. 이상과 같이 임신 중 고열은 외배엽 기원의 장기뿐만 아니라 중배엽성 장기의 정상 발생과정에도 영향을 미쳐 선천성 기형을 유발함을 알 수 있다.

한편, 임신 중 고열이 치아의 발생에 미치는 영향에 대한 보고는 Yoo 등 (2007)이 고열에 노출된 생쥐 태아의 치아에서 FGF-8의 지속적인 발현과 FGF-4의 발현 억제가 일어나 치아의 발생이 억제된다고 보고한 논문을 제외하고 거의 없다. Tung 등 (2006)이 고열을 일으키는 turpentine을 흰쥐에 투여한 결과 앞니의 사기질 형성에 영향을 준다고 하였으나 이는 발생중인 태아에 대한 보고가 아니며 성체에서 관찰한 것이다. 이상과 같이 고열은 여러 장기에서 선천성기형과 성장지연을 유발하지만 치아의 초기 발생과정에 미치는 영향에 대해 보고된 결과는 아직 없다.

포유류에서 치아발생은 신경능선 기원의 중간엽 세포와 구강상피 사이의 연속적인 상호작용에 의해 조절된다. 이러한 상호작용에는 많은 인자들이 관련되어 있으며, 특히 신호전달중심(signaling center) 역할을 하는 사기질결절에서는 Shh, FGF, BMP와 Wnt 유전자군을 포함하여 최소한 10가지의 다른 신호전달물질이 발현되고(Jernvall과 Thesleff 2000), 중간엽에서 발현되는 BMP가 사기질결절을 형성한다(Jernvall 등 1998). 이러한 정상 치아발생과정 중 여러 가지 신호전달물질의 발현은 생쥐를 이용한 실험에서 잘 밝혀져 있다. 구강상피에서 기원한 치아관은 중간엽으로 성장해 들어가 치아뿌를 형성한다. 이 과정 동안 치아뿌의 끝에 있는 상피에 일차사기질결절이 형성되고, 이곳 가까이 위치한 중간엽 세포가 치아유두를 형성한다. 이 단계가 치아발생의 싹시기이다(Thesleff 등 2001). 사기질결절은 FGF를

분비하여 주변의 상피세포를 증식시켜 치아목고리를 형성하며, 중간엽으로부터 FGF-3을 발현하게 하여 치아유두를 만든다(Kettunen 등 1998, 2000). 이 과정이 치아발생의 모자시기이며, 일차사기질결절은 FGF 수용체가 없으므로 증식하지 못하고 세포자멸사에 의해 제거된다. 따라서 일차사기질결절이 있던 부분에 주름(folding)이 생겨 발생중인 치아는 종시기에 돌입한다(Jernvall과 Thesleff 2000). 종시기 동안 치아도드리에서 새로운 이차사기질결절이 형성되며, 세포자멸사를 통해 소실된다(Coin 등 1998). 이차사기질결절의 기능은 치아도드리의 위치 확립이며, 이것은 종 특이성(species-specific)을 갖는다. 즉, 이차사기질결절은 FGF-4를 분비하여 세포증식을 유도하고, 동시에 p21 경로를 통해 사멸하므로 종마다 고유한 치아머리(dental crown)의 형태가 만들어진다(Jernvall 등 2000).

FGF는 상피세포, 중배엽세포 및 신경외배엽 기원 세포의 증식과 분화를 담당하며, 생쥐에서는 23개의 아형이 있다고 알려져 있고(Powers 등 2000, Itoh와 Ornitz 2008), 치아발생에서는 치아상피의 성장과 주름형성을 조절하는 중요한 인자이다. 이 중 FGF-8은 치아의 초기발생 단계에 작용하여 치아가 형성될 부위를 결정하는 인자이다. 즉, 치아가 형성될 지역의 외배엽세포는 FGF-8을 발현하며, Pax9을 포함하여 여러 전사인자의 발현을 유도하여 치아발생이 싹시기 이후에도 계속 진행되게 한다(Mandler와 Neubüser 2001). Kettunen과 Thesleff (1998)는 FGF-8 mRNA는 태령 10일에는 구강상피에서, 11일에는 치아기원판에서 감지되고, 이후 점차 감소하여 태령 13.5일에는 치아싹의 먼쪽부분에서만 주로 발현한다고 보고하였다. 본 실험에서 FGF-8은 대조군의 경우 태령 13일에 싹시기의 치아관 첨부의 상피세포에서 양성반응을 보였고, 실험군에서는 치아싹의 발생이 대조군에 비해 지연되어 있었다. 또한 태령 15일 모자시기에서는 치아상피에서는 양성반응을 보이지 않았지만 치아속질의 중간엽세포에서는 양성반응을 나타내고 있었다. 그러나 실험군 태령 15일에서는 아직도 싹시기의 치아 소견을 보이고 있었으며, 장차 치아목고리로 분화할 부위의 세포에서

여전히 양성반응을 보이고 있어, 대조군에 비해 발현이 지연되고 있는 소견을 관찰하였다. 태령 17일 대조군에서 치아는 종시기의 형태를 보이고 있었으며, 장차 중간엽세포로 분화할 세포에서 양성반응을 나타내었다. 실험군에서는 치아목고리에 위치한 사기질모세포에서 양성반응이 관찰되었고, 중간엽세포는 음성반응을 보였다. 이러한 결과는 실험군이 대조군에 비해 치아의 발생이 지연되고 있음을 보여주는 소견이라고 생각된다.

BMP는 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )의 한 요소이며, 분화, 세포자멸사 및 세포외바탕질 생성에 중요한 역할을 담당하고, 특히 치아상피에서는 BMP-2, -4, -7이 발현된다(Aberg 1997). 발생중인 생쥐 치아에서 발현되는 여러 가지 BMP 유전자 중 BMP-4가 가장 광범위하게 연구되고 있으며, 치아 발생에서 중추적인 역할을 하는 것으로 인정되고 있다(Thesleff와 Mikkola, 2002). 치아상피의 BMP는 중간엽의 BMP 발현을 조절하며, 중간엽의 BMP-4는 *Lef1*의 발현을 상향 조절하여 싹시기부터 모자시기 동안 사기질결절의 형성에 관여하는 FGF-4를 발현하게 한다(Kratochwil 등 2002). 생쥐 치아의 정상 발생과정에서 BMP-4는 태령 11일에는 치아상피에 국한되어 있지만 이후 싹시기가 되면 중간엽에서 발현된다(Zhang 등, 2000). 모자시기와 종시기 동안 BMP-4는 치아속질 중간엽세포, 치아유두세포와 상아질모세포에서만 발현된다고 알려져 있으나 Feng 등(2002)은 사기질결절과 사기질모세포에서도 발현된다고 하였다. 본 연구에서 BMP-4는 태령 13일 대조군 치아상피에서는 발현되지 않았으나 실험군에서는 치아판의 치아상피에서 양성반응을 보이는 다수의 세포가 관찰되어 BMP-4의 발현이 치아상피에서 지속되고 있었다. 태령 15일에서는 대조군의 경우 상아질모세포로 분화할 중간엽세포에서 양성반응을 보였으나 실험군에서는 음성반응을 나타내었고, 태령 17일에 대조군은 치아속질 내 대부분의 세포가 양성반응을 보였지만 실험군의 경우 치아속질 내 중간엽세포는 음성반응을 나타내었을 뿐만 아니라 치아상피에서도 양성반응을 보이는 세포가 관찰되었다. 이러한 결과는 치아가 발생하는 동

안 정상적으로 중간엽세포에서 BMP-4가 발현되어야 하지만 실험군에서는 음성반응을 보였고, 발생이 진행되는 동안에도 치아상피에서 지속적인 발현을 보이는 바, 고열로 인하여 치아의 정상 발생이 지연되는 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 임신 중 고열은 치아판 성장을 억제하고, FGF-8의 발현을 지연시키며, 치아속질 내 중간엽세포에서 BMP-4 발현을 저해하여 치아의 정상적인 발생 중 나타나는 상피-중간엽 상호작용을 방해하는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

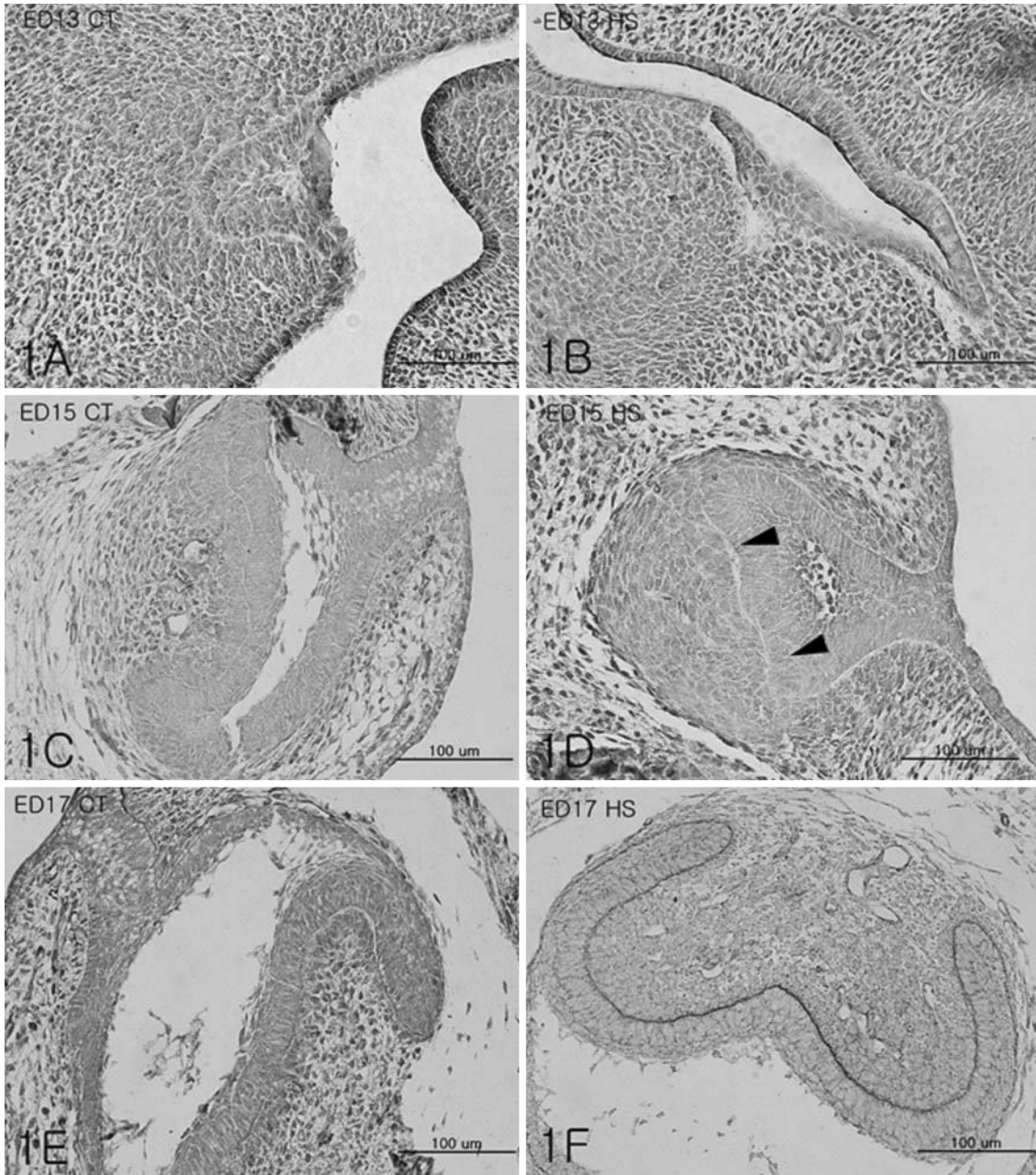
- Aberg T, Wozney J, thesleff I : Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* 210: 383-396, 1997.
- Arora KL, Cohen BJ, Beaudoin AR : Fetal and placental responses to artificially induced hyperthermia in rat. *Teratology* 19: 251-259, 1979.
- Chen YP, Maas R : Signaling loops in the reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of mammalian tooth development. In: *Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis*. Choung C-M, editor. Austin, TX: r.G. Landes, pp 265-282, 1998.
- Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV : Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol* 43: 261-269, 1998.
- Feng JQ, Zhang J, Tan X, Lu Y, Guo D, Harris SE : Identification of cis-DNA regions controlling *Bmp4* expression during tooth morphogenesis in vivo. *J Dent Res* 81: 6-10, 2002.
- Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keränen S, Thesleff I : The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125: 161-169, 1998.
- Jernvall J, Keränen S, Thesleff I : Evolutionary modification of development in mammalian teeth: quantifying gene expression patterns and topography. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14444-14448, 2000.

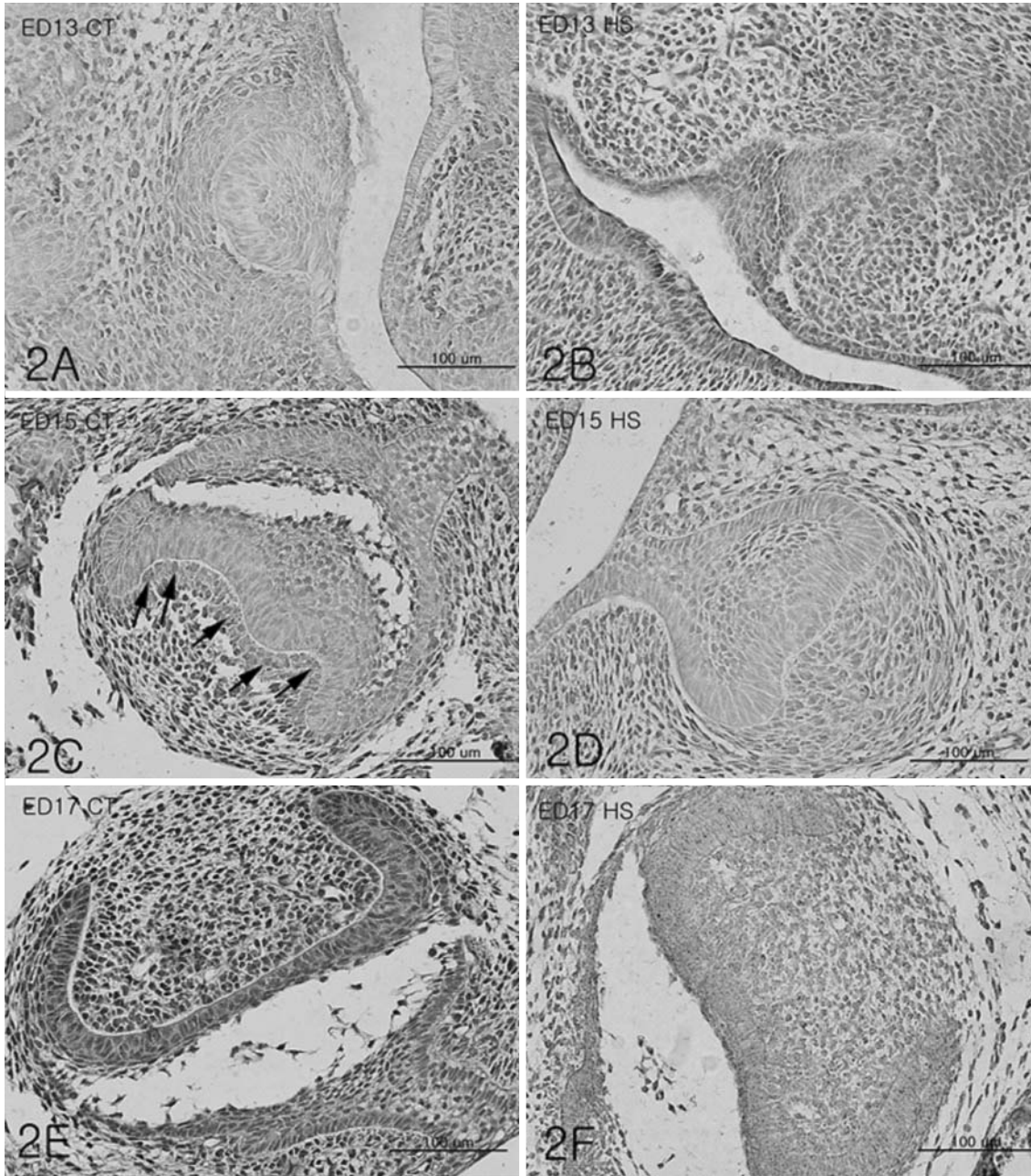
- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I : Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol* 38: 463-469, 1994.
- Jernvall J, Thesleff I : Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 92: 19-29, 2000.
- Kettunen P, Laurikkala J, Itaranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I : Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 219: 322-332, 2000.
- Kettunen P, Karavanova I, Thesleff I : Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: Expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet* 22: 374-385, 1998.
- Kettunen P, Thesleff I : Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 211: 256-268, 1998.
- Kim WK : Effects of maternal hyperthermia on the development of C57/BL6 strain Hsp70 Knock-out mice fetuses. *Korean J Phys Anthropol* 18: 105-113, 2005. (in Korean)
- Kim WK, Mirkes PE : Alterations in mitochondrial morphology are associated with hyperthermia-induced apoptosis in early postimplantation mouse embryos. *Birth Defects Research (Part A)* 67: 929-940, 2003.
- Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grossche R : FGF-4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in LEF1 (-/-) mice. *Genes Dev* 16: 3173-3185, 2002.
- Little SA, Kim WK, Mirkes PE : Teratogen-induced activation of caspase-6 and caspase-7 in early postimplantation mouse embryos. *Cell Biol Toxic* 19: 215-226, 2003.
- Lumsden AGS : Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cell in the initiation of mammalian tooth germ. *Development* 103: 155-169, 1988.
- Mandler M, Neubüser A : FGF signaling is necessary for the specification of the odontogenic mesenchyme. *Dev Biol* 240: 548-559, 2001.
- Martinez-Frias ML, Mazario MLG, Caldas CF, Martinez-Frias ML, Garcia Mazario MJ, Conejero Gallego MP, Bermejo E, Rodriguez-Pinilla E : High maternal fever during gestation and severe congenital limb disruptions. *Am J Med Genet* 98: 201-203, 2001.
- Miller P, Smith DW, Shepard TH : Maternal hyperthermia as a possible cause of anencephaly. *Lancet* I: 519-521, 1978.
- Mirkes PE : 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal development. *Teratology* 65: 228-239, 2002.
- Morishima HO, Glaser B, Niermann WH, James LS : Increased uterine activity and fetal deterioration during maternal hyperthermia. *Am J Obstet Gynecol* 121: 531-538, 1975.
- Oh JK, Kim WK : Effects of maternal hyperthermia on the palatal mesenchyme development of Hsp70 Knock-out mice fetuses. *Korean J Phys Anthropol* 18: 115-130, 2005. (in Korean)
- Ohazama A, Tucker A, Sharpe PT : Organized tooth-specific cellular differentiation stimulated by BMP4. *J Dent Res* 84: 603-606, 2005.
- Itoh N, Ornitz DM : Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn* 237: 483-491, 2008.
- Pipsa J, Thesleff I : Mechanism of ectodermal organogenesis. *Dev Biol* 262: 195-205, 2003.
- Powers CJ, McLesky SW, Wellstein A : Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7: 165-197, 2000.
- Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR : Targeted disruption of FGF-8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 13: 1834-1846, 1999.
- Tabata MJ, Fujii t, Liu JG, Ohmori T, Abe M, Wakisaka S, Iwamoto M, Kurisu K : Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice. *Eur J Oral Sci* 110: 114-120, 2002.
- Thesleff I, Hurmerinta K : Tissue interactions in tooth development. *Differentiation* 18: 75-88, 1981.
- Thesleff I, Keränen S, Jernvall J : Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 15: 14-18, 2001.
- Thesleff I, Mikkola M : The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* 217: 93-135, 2002.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T : Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Conn Tiss Res* 32: 9-15, 1995.
- Tucker AS, Yamada G, Grigoriou M, Pachnis V, Sharpe P : Fgf-8 determines rostral-caudal polarity in the first bran-

- chial arch. *Development* 126: 51-61, 1999.
- Tung K, Fujita H, Yamashita Y, Tagaki Y : Effect of tupepine-induced fever during the enamel formation of rat incisor. *Arch Oral Biol* 51: 464-470, 2006.
- Vahtokari A, Aberg T, Thesleff I : Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* 122: 121-129, 1996.
- Vogel A, Rodriguez C, Izpisua-Belmonte J : Involvement of FGF-8 in the initiation, outgrowth and patterning of vertebrate limb. *Development* 122: 1737-1750, 1996.
- Wilkie AOM, Morris-Kay GM, Jones EY, Heath JK : Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr Biol* 5: 500-507, 1995.
- Yoo JY, Shim YT, Lee J, Ahn S, Kim JR, Kim WK : Immunohistochemical study on early odontogenesis in Hsp 70 Knock-out mice fetuses exposed by maternal hyperthermia. *Korean J Aant* 40: 47-56, 2007. (in Korean)
- Yoo SH, Lee J, Ahn SG, Kim WK : Delayed endochondral ossification in Hsp 70 Knock-out mice fetuses due to maternal hyperthermia. *Korean J Aant* 38: 215-225, 2005. (in Korean)
- Zhang YD, Zhang ZY, Zhao X, Yu X, Hu Y, Geronimo B, Fromm SH, Chen YP : A new function of BMP4: dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development* 127: 1431-1443, 2000.

## Legends for Figures

- Fig. 1.** Immunolocalization of FGF-8 in the developing molar tooth. At ED 13, positive cells are found in the dental epithelium of the control tooth bud (A), and in the dental lamina in heat shocked (HS) group (B). At ED 15, basal lamina and some cells in the dental papilla mesenchyme are shown positive reaction in cap-staged developing tooth in control group (C), whereas developing tooth of HS group shows early cap-stage, and positive cells are located in the both cervical loop tips (D). At ED 17, positive reactions are revealed on the basal lamina and mesenchymal cells in early bell staged tooth of control group (E), however, basal lamina and some cells in both cervical loop tips show immuno-positive in HS group (F). Scale bar=100  $\mu$ m.
- Fig. 2.** Immunolocalization of BMP-4 in the developing molar tooth. At ED 13, positive reactions are detected along the basal lamina in bud-staged developing tooth in control group (A). Positive dental epithelial cells are shown in HS group (B). At ED 15, some mesenchymal cells beneath the ameloblast are revealed positive reaction in control group (C). However, in HS group, dental epithelium, basal lamina and mesenchymal cells show negative reaction at ED 15 (D). At ED 17, most of mesenchymal cells in dental pulp shows positive reaction in control group (E), whereas, negative reaction is found in mesenchymal tissue in HS group (F).





Abstract

## The Effects of Hyperthermia on FGF-8 and BMP-4 Expression during Early Odontogenesis in Hsp70 Knock-out Mice Fetuses

Dong-Choon Ahn, Jong-Ryong Kim<sup>1</sup>, Won-Kyu Kim<sup>1</sup>

*Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Kangwon National University*

<sup>1</sup>*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University*

---

During early tooth development, multiple signaling molecules are expressed in the dental lamina and induce the dental mesenchyme. One signal, FGF-8, is expressed in the early dental epithelium, another one, BMP-4, has been shown to induce morphologic changes in dental mesenchyme. Meanwhile, hyperthermic exposure during pregnancy, as one of teratogens, is known to disturb normal development and induce several congenital anomalies. This study is aimed to investigate the effects of maternal hyperthermia on the expressions of FGF-8 and BMP-4 in early odontogenesis.

The pregnant Hsp70 knock-out at gestational day 8 were immersed in 43°C water bath until their body core temperature reached at 43°C. Thereafter, pregnant mice were given more 5 minutes hyperthermic exposure. Heat-untreated Hsp70 KO mice fetuses were used as the control group. Fetuses were collected at embryonic day (ED) 13, 15 and 17. Developing tooth in the mandible was processed for immunohistochemical study. Tissue sections were immunostained for FGF-8 and BMP-4 and observed with light microscope. The obtained results were as follows:

Tooth development in the heat shocked (HS) group is delayed rather than the control group in the given developmental period. FGF-8 immunolocalization in control group at ED 13 was gradually decreased compared to the HS group which showed continuously positive immunoreaction. BMP-4 immunolocalization was detected in dental mesenchyme, however, there was no positive immunoreaction found in HS group.

These results suggest that maternal hyperthermia should induce the early odontogenesis, delay the expression of FGF-8 in dental epithelium, and disturb the expression of BMP-4 in dental mesenchyme. Consequently, hyperthermic exposure during pregnancy affects epithelial-mesenchymal interactions.

---

**Key words :** Hyperthermic exposure, Early odontogenesis, FGF-8, BMP-4, Immunohistochemistry