

흰쥐 절치의 법랑질 형성에 미치는 불소의 효과에 관한 현미경적 연구

임도선, 장병수², 정제오¹, 정순정¹, 정문진^{1*}
서울보건대학 치위생과, ²한서대학교 보건학부 피부피용학과,
¹조선대학교 치과대학 구강조직학교실

A Microscope Study of Fluoride Effects on the Rat Incisor Enamel Formation

Do-Seon Lim, Byung-Soo Chang², Je-O Jeong¹,
Soon-Jeong Jeong¹ and Moon-Jin Jeong^{1*}

Department of Dental Hygiene, Seoul Health College, Sungnam, ²Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, ¹Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea

(Received June 2, 2004; Accepted June 17, 2004)

ABSTRACT

The aim of the present study was to examine in detail, both at light and electron microscopical levels, the morphological variations in ameloblast of the fetal rat incisor enamel organ. Rats were started on distilled water at the beginning of pregnancy. The pups were sacrificed 11 days after delivery and animals were perfused intravascularly with glutaraldehyde and the incisors were removed. To examine on the ultrastructure of the ameloblast, the study employed primary light microscopy but electron microscopy was used to clarify some of the light microscopic finding. Longitudinal sections through the incisors of the rat show a continuous layer of ameloblasts on the labial surface of the tooth. This layer contains the entire sequence of developmental stages in enamel production. The ameloblast layer was divided into three main zones: 1) Presecretory zone, region of ameloblasts facing pulp. 2) Secretory zone, region of inner and outer enamel secretion. 3) Maturation zone, region of reduced ameloblasts. In particularly, the present study has shown that two distinctively different types of ameloblasts appear in the enamel organ during enamel maturation in the rat incisor. These two types have been designated ruffle ended ameloblasts (rAB) and smooth ended ameloblasts (sAB). The fluoride produces marked alteration in the fine structure of ameloblast from teeth of young rats, such as large confluent distensions of the endoplasmic reticulum and swelling of isolated mitochondria. This experimental data suggested that exposure prolonged of animal to high level of fluoride appears to induce a few dramatic changes in the normal appositional growth and initial mineralization of enamel created during amelogenesis.

Key words : Amelogenesis, Fluoride, Ruffle ended ameloblast, Sooth ended ameloblast

이 논문은 2003년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

* Correspondence should be addressed to Dr. Moon-Jin Jeong, Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Gwangju, 501-825 Korea. Ph.: 062-230-6895, FAX: 062-224-3706, E-Mail: mjeong@chosun.ac.kr

서 론

법랑질형성(amelogenesis)시 법랑모세포(ameloblast)는 분비기(secretory stage)를 거쳐 성숙기(maturation stage)로 지나게 되는데, 이때 법랑모세포는 법랑질 성숙 기능을 영위할 수 있도록 상당한 미세구조적 변화를 한다. 일시적인 이행기가 있는 후, 주기적인 활동에 들어간다. 법랑질에서 플라와 유기물질을 선택적으로 제거하는 제거주기와 무기이온을 추가로 공급하는 공급주기가 교대로 나타난다. 이 주기적 과정은 법랑모세포의 미세구조에 주름끝(ruffled ended)과 평탄끝(smooth ended)을 갖는 세포로 각기 반영된다. 주름끝법랑모세포(ruffle-ended ameloblast)는 이온을 추가하는데 관여하고, 평탄끝법랑모세포(smooth-ended ameloblast)는 플라 단백질 제거하는데 관여한다(Ten Cate, 1996). Josephsen & Fejerskov(1977)는 광학 및 전자현미경을 이용하여 백서 절치에서 법랑질형성과정 중 성숙대에서 두가지 타입의 법랑모세포의 형태학적 변화양상에 관하여 보고하였다.

법랑질형성에 대해서는 많은 연구가 계속되어 법랑모세포의 생활주기나 유기기질에 대해 어느 정도는 알려져 있으나 법랑단백질의 합성과 분비 및 석회화시 단백질의 운명에 대해서는 아직도 명확하게 밝혀져 있지 않다. 더욱이 정상적인 법랑질형성에 관해서는 비교적 활발하게 연구가 진행되고 있으나 비정상 상태에서의 법랑질형성에 변화에 관해서는 거의 드문 실정이다. Marthaler(1979)는 불소가 치아 경조직의 석회화와 관련 있으므로 법랑질 발육의 말기, 즉 성숙기에 불소의 대부분이 침착된다고 하였고, Hammarström(1971)은 흰쥐 구치와 절치의 성숙기 법랑질에서는 ^{18}F 가 흡수되지 않고 분비기와 전환기의 법랑질에만 ^{18}F 가 흡수되었다고 보고하는 등, 법랑질의 발육단계에 따른 불소 농도 및 불소침착 양상에 대하여 몇몇 연구가 진행되었다. 또한 법랑질형성시 방사선에 의한 법랑질 표면의 변화, 법랑모세포의 형태 변화 및 배열변화 등에 관한 연구가 있다. 방사선 감수성을 비교 연구한 논문들은 주로 법랑모세포와 상아모세포를 비교하였는데 법랑질형성이 상아질형성보다 방사선에 민감하였다고 한 Lindvall et al.(1972)을 제외하고는 대부분의 경우는 상아모세포가 법랑모세포보다 더 방사선에 민감하게

반응하였다고 보고하고 있다. 또한 발육중인 치배에 방사선이 조사되면 골양상아질형성과 상아질함량과 같은 상아질형성 이상과 법랑질 형성부전이 일어나며 치아의 맹출 속도가 감소하게 된다고 보고하였다(Gartner et al., 1977).

이와 같이 현재까지의 보고에서 정상적인 법랑질형성에 관해서는 기질 단백질의 분비과정, 법랑질 표면의 변화, 법랑모세포의 형태변화 및 배열변화에 관한 연구 등, 비교적 활발하게 연구가 진행되고 있다. 그러나 지금까지 보고된 연구들은 성체에 국한된 법랑질형성 과정에 따른 법랑모세포의 변화에 관한 결과가 주류를 이루고 있을 뿐, 태아형성과정에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 이에 저자들은 태아형성에 따른 법랑질형성과정을 알아보려고 생후 11일 되는 어린흰쥐를 대상으로 백서태아의 발육시기에 따른 변화, 즉 법랑모세포의 생활 주기로 알려진 전분비대(zone of presecretion), 분비대(zone of secretion), 성숙대(zone of maturation)에서 백서태아의 법랑질형성 동안에 일어나는 법랑모세포의 형태 및 구조적 변화를 광학현미경과 투과전자현미경으로 관찰하여 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

체중 150~200g 내외의 Sprague-Dawley계 건강한 흰쥐 30마리를 선별하여 임신시켰다. 대조군 어미흰쥐에게 임신직후부터 출산 후 11일까지 증류수를 공급하였고, 실험군은 어미흰쥐에 100ppm, 200ppm 및 300ppm의 각기 다른 농도의 불소용액을 식수로 제공한 후, 출산 후부터는 증류수를 공급하였다. 이후 출생 11일째 되는 체중 20~25g 내외의 어린 흰쥐를 대조군과 세 그룹의 실험군으로 나누어 형태 및 구조적 분석에 사용하였다.

2. 광학현미경적 방법

불소 투여에 따른 법랑모세포의 형태적 변화를 관찰하기 위하여, 생후 11일째 되는 체중 20~25g 내외의 흰쥐를 4 그룹으로 나누어 실험하였다. 각 그룹의 어린 흰쥐를 ether로 마취시킨 후, 2.5% glutaraldehyde

용액 (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)으로 좌심실을 통하여 관류고정한 후, 하악을 절취하여 동일 용액에 1시간 30분 동안 전고정하고 4% EDTA 용액 (2.5% glutaraldehyde)에 약 4주 동안 냉장실에서 탈회하였다. 탈회가 끝난 시료를 흐르는 수돗물에 수세한 다음, 단계적으로 ethanol에서 탈수하고 xylene으로 치환하여 paraffin (56~58°C)으로 포매하였다. 포매된 시료는 절편기 (Reichert-Jung 2050, Germany)를 이용하여 5 μ m 두께로 정중시상면으로 절단하고 slide glass 위에 부착시킨 후, 신전기 위에서 12시간 동안 건조시켰다. 건조된 절편은 paraffin을 제거한 다음 수화시켜서 modified multiple stain (Polyscience Co.)으로 염색하였다. 염색이 끝난 절편은 탈수과정을 거쳐 Poly-Mount로 봉입하여 광학현미경으로 각 발달시기의 법랑모세포의 형태를 관찰하였다. 그리고 광학현미경 (Olympus BH-2, Japan)으로 관찰한 표본에서 발달시기를 확인한 후, 각 시기별로 미세한 세포내 변화를 확인하기 위하여 투과전자현미경 (H-7600, Japan)으로 관찰하였다.

3. 투과전자현미경적 방법

불소 투여에 따른 법랑모세포의 미세구조를 관찰하기 위하여 각 그룹의 어린 흰쥐를 ether로 마취시킨 후, 2.5% glutaraldehyde 용액 (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)으로 좌심실을 통하여 관류고정한 후, 하악을 절취하여 동일 용액에 1시간 30분 동안 전고정하고 4% EDTA 용액으로 4°C에서 약 4주 동안 탈회하였다. 탈회가 끝난 후 2% O₃O₄ 용액에 후고정하고 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 2회 세척 후, 단계적으로 ethanol에서 탈수하였다. 미세구조관찰을 위해서 전지를 횡단면으로 3등분하여 Epon mixture에 포매하고 1 μ m 박절편을 toluidine blue 용액으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 동일한 부위에서 은색절편을 제작하여 copper grid (200 mesh)에 부착시킨 후, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경 (H-7600, Japan)으로 80 kV 하에서 관찰하였다.

결 과

흰쥐 절치의 근첨부에서 절단면 방향으로 전분비대,

분비대 및 성숙대가 관찰되었으며 각 대(zone)의 세포형태의 광학 및 전자현미경 소견은 다음과 같다.

1. 전분비대 (presecretory zone)

1) 대조군

광학현미경 소견 : 대조군의 전분비대에서 중간층은 편평형의 세포로 구성되어 있었으며, 법랑모세포층에 위치한 세포들은 입방형 또는 키가 낮은 원주세포의 형태를 취하고 있었다. 세포질의 대부분은 핵으로 가득 차 있었고, 세포의 핵은 modified multiple stain에 진하게 염색되는 인이 관찰되었다. 이 세포들은 여러 층으로 구성된 중층을 형성하였고, 입방형의 세포들은 주로 기저부위에 그리고 원주형의 세포들은 세포층의 기저 위쪽에서 관찰되었다. 상아기질층은 치수와 접하고 있었고, modified multiple stain에 약하게 염색되었으며, 치수는 가장 내측에 위치하고 있었다 (Fig. 1a).

전자현미경 소견 : 법랑모세포층을 구성하고 있는 세포들은 대부분 입방형으로 확인되었고, 전자밀도가 높은 세포와 전자밀도가 낮은 세포가 혼재되어 분포되어 있었다. 세포의 핵은 세포질의 대부분을 차지하고 있었고, 핵 내에서는 중앙, 또는 측면으로 위치한 전자밀도가 높은 인의 구조가 확인되었으며, 핵막을 따라 균일하게 이질염색질이 분포하는 등 미분화된 세포의 전형적인 핵 구조가 관찰되었다. 입방형의 세포질 내에는 조면소포체와 미토콘드리아 등이 확인되었으나 그 밖의 세포소기관의 발달이 미약하였다. 상아전질과 접하고 있는 법랑모세포의 세포질에서는 리보솜들이 산재되어 있었고 세포간의 결합은 확인되지 않았다. 또한 상아전질은 결정구조로 이루어져 있었다 (Fig. 1b).

2) 실험군

광학현미경 소견 : 불소농도 100 ppm 투여군에서 전분비대의 법랑모세포층을 구성하고 있는 세포들은 대조군과 비교하여 세포의 수적인 감소가 관찰되었다. 또한 법랑모세포층을 구성하는 세포들은 modified multiple stain에 약하게 염색된 세포들과 강하게 염색된 세포들로 이루어져 있었다. 주로 약하게 염색된 세포들은 기저막을 따라 배열되어 있었고, 이들 세포들 사이에 강하게 염색된 세포들이 위치하고 있었다 (Fig. 2a). 불소농도 200 ppm이 투여된 실험동물에서 법랑모세포

층은 전반적으로 modified multiple stain에 고른 염색 양상을 나타내었다. 이 층을 구성하고 있는 세포들은 100 ppm과 비교하여 수적으로 다소 증가되어 관찰되었다(Fig. 3a). 반면, 불소농도 300 ppm을 투여한 실험군에서는 상아기질층과 접한 부위가 일정한 간격으로 떨어져 있었으며, 이 부위에서는 법랑모세포층을 구성하는 세포들의 일부분이 떨어져 세포질의 잔여체들이 관찰되었다(Fig. 4a).

전자현미경 소견: 불소농도 100 ppm 실험군에서 전분비대의 법랑모세포층을 구성하는 세포들은 신장된 원주형으로 관찰되었으며, 이들 세포사이에서 압착되어 전자밀도가 높은 세포들이 부분적으로 관찰되었다. 세포질 내에는 전반적으로 리보솜들이 산재되어 있었고 핵 위쪽에서 간상형의 미토콘드리아들이 군집되어 있었으며, 이들 미토콘드리아의 기질내에는 라멜라형의 동심원상 구조가 확인되었다. 미토콘드리아 주변에는 폴리솜들이 산재되어 있었으며 조면소포체의 막 부위에 위치한 리보솜의 분리현상이 관찰되었다. 법랑모세포에 원위부위는 대조군에 비해 전자밀도가 낮게 관찰되었다. 상아전질은 대조군과 비교하여 섬유성 구조가 드물게 관찰되었고 전자밀도 또한 낮게 관찰되었다(Fig. 2b). 그리고 불소농도 200 ppm 실험군의 전분비대 법랑모세포에서는 핵 주변의 리보솜들은 응집되어 폴리솜의 형태를 하고 있었다. 핵 주변에 위치한 미토콘드리아들은 심하게 붕괴되어 있었고, 조면소포체의 경우 소포체의 단위막 구조가 유실되어 관찰되었다. 법랑모세포의 원위부 세포질내에는 폴리솜 형태로 리보솜들이 응집되었고, 일부 미토콘드리아내에 라멜라 구조가 관찰되었으며, 대다수 미토콘드리아의 막성 구조가 소실되어 관찰되었다. 또한 상아전질에 인접한 세포질을 따라 다수의 소낭들이 관찰되었다(Fig. 3b). 한편, 불소농도 300 ppm 실험군의 전분비대에서는 길게 신장된 법랑모세포의 세포질이 전반적으로 전자밀도가 낮게 관찰되었으며, 부분적으로 이 세포들 사이에서 세포소기관을 구분할 수 없을 정도로 전자밀도가 높은 세포들도 관찰되었다. 법랑모세포 원위부위의 세포질은 상아전질 쪽으로 탈락되어 떨어져 관찰되었고, 세포질내에는 미토콘드리아들이 붕괴되고 세포막은 유실되어 나타났다. 그리고 이 시기에 법랑모세포내의 조면소포체 구조는 원주형인 세포의 장축방향을 따라

정돈되어 있는 형태로 관찰되었다(Fig. 4b).

2. 분비대(secretory zone)

1) 대조군

광학현미경 소견: 분비대를 구성하는 법랑모세포층의 세포들은 전반적으로 길게 신장된 원주형의 세포들로 이루어져 있었다. 이 세포들의 핵은 난형으로 기저부위방향에 분포하고 있었으며, 핵 주변의 근위부에는 세포질과 비교하여 이질염색성을 띄는 과립들이 규칙적인 양상으로 분포하였다. 법랑질과 경계를 이루는 법랑모세포들의 세포질은 툼니바퀴의 형태를 이루고 있었다. 법랑모세포들의 원위부의 세포질에는 불규칙한 형태의 공포들이 다수 법랑질 방향으로 집적되어 있었다(Fig. 5a).

전자현미경 소견: 분비대를 구성하고 있는 세포의 핵은 기저부위에 위치하였고 대부분 난형으로 관찰되었다. 핵 내에는 전반적으로 이질염색질이 분포하고 있었으며, 핵막을 따라 이질염색질이 집적되어 관찰되었다. 법랑모세포들의 세포막의 경계가 명확하지 않았으며 세포질은 전반적으로 전자밀도가 높게 관찰되었다. 기저부위에서는 다수의 미토콘드리아들이 관찰되었다. 법랑질과 인접한 법랑모세포들은 부착반에 의해 결합되어 있었고 불규칙한 Tome's 돌기가 확인되었다. Tome's 돌기 내에는 세포질 막을 따라 작은 분비과립들이 다수 관찰되었다. 또한 Tome's 돌기와 인접한 부위의 법랑질 내에는 무정형의 섬유성 물질들과 규칙적으로 배열되어 있는 광화되는 법랑기질이 관찰되었다(Fig. 5b).

2) 실험군

광학현미경 소견: 분비대에서 불소농도 100 ppm이 투여된 실험군의 법랑모세포는 대조군과 비교하여 세포의 수적인 감소가 관찰되었다. 법랑모세포들은 세포질 전반에 공포를 다수 지니고 있었으며 세포의 핵들은 정상조직과 비교하여 좀 더 신장된 형태로 확인되었다. 정상조직에서 핵의 근위부에서 관찰되었던 과립들의 염색성은 다소 저하되어 관찰되었다. 또한 법랑질과 접하는 법랑모세포의 세포질은 뚜렷한 툼니바퀴 모양으로 관찰되었다(Fig. 6a). 불소농도 200 ppm 실험

군에서 법랑모세포들은 100 ppm과 비교하여 더욱 신장된 형태를 하고 있었고 modified multiple stain에 염색성 저하를 나타내었다. 세포질 내에서 관찰되는 공포들은 주로 법랑질과 경계하고 있는 세포질 쪽에 분포되어 관찰되었으나, 100 ppm 실험군에 비해 수적으로 감소되었다(Fig. 7a). 그리고 불소농도 300 ppm에서는 다른 군들과 비교하여 법랑모세포층과 중간층과의 경계부위는 염색성이 저하되어 관찰되었다. 법랑질과 접한 부위는 법랑모세포의 세포질과 비교하여 불규칙한 간격으로 약한 염색성을 나타내었다(Fig. 8a).

전자현미경 소견: 불소농도 100 ppm 실험군의 분비대에서 법랑모세포 핵은 기저부위에 위치하며 세포의 형태와 동일한 원주형으로 관찰되었다. 핵의 아래쪽인 기저부위에는 간상형의 미토콘드리아들이 집적되어 있었으며, 이들의 막성구조는 대부분 유실되어 미토콘드리아 기질들이 세포질 내에 산재되어 있었다. 또한 이 시기에 그 주변부는 대조군에 비해 막성 구조로 되어있는 조면소포체의 팽창이 관찰되었다. 법랑질과 접해있는 원위부위의 세포구조는 대부분 파괴되어 법랑질과 융합된 형태로 관찰되었다(Fig. 6b). 불소농도 200 ppm 실험군 분비대의 법랑모세포에서 집적된 미토콘드리아의 위치는 대조군과 100 ppm 투여군과 동일하게 핵 아래에 기저막 부위에 위치하고 있었다. 이들 미토콘드리아들은 100 ppm 투여군과 비교하였을 때, 미토콘드리아 기질내에 전자밀도가 높은 라멜라 구조가 관찰되었으며 조면소포체의 막성 구조로부터 리보솜이 탈락되어 관찰되었다. 또한 핵막과 인접해 있는 조면소포체의 막 구조는 유실되었다. 그리고 법랑질과 접해있는 원위부위의 세포구조는 100 ppm 투여군에 비해 보다 정돈된 상태로 관찰되었으나, 세포질내의 소면소포체 구조는 팽창과 막성계의 유실 등 막 구조의 붕괴가 관찰되었다(Fig. 7b). 그리고 불소농도 300 ppm 실험군 분비대에서 법랑모세포의 기저부위에 위치하고 있는 미토콘드리아는 대조군, 100 ppm 및 200 ppm 등과 비교하였을 때, 미토콘드리아에서 라멜라 형태의 동심원상 구조가 관찰되었으며, 미토콘드리아의 기질은 붕괴되어 크리스타의 구조가 유실된 채 관찰되었다. 또한 이 부위의 세포질 내에는 조면소포체의 팽창으로 인한 커다란 공포들이 다수 관찰되었으며, 대부분 막성 구조가 유실되거나 리보솜이 탈락

되어 세포질 내에서 폴리솜 형태를 취하며 응집되어 있었다. 법랑모세포의 원위부위 세포질 내의 조면소포체들은 오히려 수축되어 내포 구조가 좁게 관찰되었다. 주변 세포질 내에는 이들 조면소포체로부터 탈락되어 폴리솜과 같은 구조를 형성하였던 것들의 팽창이 관찰되었다(Fig. 8b).

3. 성숙대 (maturation zone)

1) 대조군

광학현미경 소견: 성숙대에서는 법랑질 성숙에 따른 평탄골 법랑모세포와 주름골 법랑모세포가 관찰되었다. 성숙대를 구성하고 있는 세포들은 분비대를 구성하고 있는 법랑모세포들과 비교하여 단위면적당 세포의 수가 감소되어 관찰되었다. 또한 법랑모세포들은 modified multiple stain에서 대부분은 약한 염색성을 보였으나, 일부 세포들의 세포질은 다른 세포질과 비교하여 높은 염색성을 보였다. 분비대의 세포들과 동일하게 신장된 원주형의 세포로 관찰되었으나 세포의 길이는 현저하게 짧게 관찰되었다. 또한 부분적으로 기저막과 근접한 세포질에 커다란 공포를 지니고 있는 세포들이 관찰되었다. 그리고 세포질의 원위부위에는 다수의 공포들이 분포되었으며, 법랑모세포와 법랑질의 경계부위는 직선상으로 평탄하게 관찰되었다(Fig. 9a).

전자현미경 소견: 성숙대의 법랑모세포들은 기저부위에서 원위부위로 갈수록 세포의 형태를 구분할 수 없을 정도로 혼재되어 있었다. 세포의 핵은 기저부위 쪽으로 치우쳐 있었으며, 핵의 주변을 따라 다수의 간상형 미토콘드리아가 위치하고 있었다. 세포의 원위부에는 간상형의 미토콘드리아가 집적되어 있었다. 법랑질과 인접한 부위의 세포질은 세포막이 함입되어 불규칙하게 주름잡힌 미로구조가 관찰되었으며, 법랑질 경계부위는 전자밀도가 법랑질과 비교하여 높게 관찰되었다. 또한 이 부위의 세포질 내에는 다수의 분비과립들이 분포되어 있었다(Fig. 9b).

2) 실험군

광학현미경 소견: 성숙대에서는 불소농도 100 ppm을 투여하였을 때, 법랑모세포들의 세포간격이 떨어진 상태로 관찰되었다. 법랑모세포들의 세포질에는 대부분 공포가 산재되어 있었으며 특히, 기저막 근위부위에 커

다란 공포들이 확인되는 등, 대조군에 비하여 전반적으로 세포 변형이 관찰되었다(Fig. 10a). 불소농도 200 ppm 투여군의 법랑모세포들은 대조군과 비교하여 세포의 조직학적 구성은 동일한 것으로 확인되었고, 100 ppm 투여군에서 전반적으로 산재되어 있던 공포들은 수적으로 감소되어 관찰되었다(Fig. 11a). 한편, 불소농도 300 ppm 투여군의 법랑모세포 기저부위에서는 세포 결합이 유실되어 세포들이 떨어져 관찰되었으나 원위부의 세포질은 대조군에 비해 밀집되어 있었다(Fig. 12a).

전자현미경 소견: 성숙대에서 불소농도 100 ppm 실험군의 법랑모세포에서 세포질은 대조군에 비해 전자밀도가 높게 나타났고, 조면소포체의 경우는 잘 정돈된 형태로 핵의 위쪽에서 관찰되었으나 대조군에 비해 팽창되어 관찰되었다. 이 시기에 미토콘드리아는 핵 위로부터 원위부위까지 전반적으로 분포되어 있었으나, 이들은 대부분 막성 구조가 유실되어 붕괴되었거나 세포질에 미토콘드리아 기질 내에서 관찰된 라멜라 형태의 중심원상 구조가 팽창됨을 동반하였다. 또한 이 시기의 법랑모세포 내에는 전반적으로 전자밀도가 다소 낮은 형태와 거의 전자밀도가 나타나지 않은 커다란 공포가 형성되었다. 전자의 경우, 붕괴된 미토콘드리아들이 융합된 형태로서 관찰되었고, 후자는 조면소포체의 팽창에 의한 공포임이 확인되었다(Fig. 10b). 불소농도 200 ppm 실험군에서 법랑모세포질의 전자밀도는 대조군에 비해 높게 관찰되었으나, 100 ppm 투여군과는 거의 동일한 양상으로 확인되었다. 특히 조면소포체는 100 ppm 투여군과 비교하였을 때, 극도로 팽창되어 세포내에 불규칙한 형태의 공포를 형성하였다. 원위부의 세포질은 대조군과 100 ppm 투여군에 비해 전자밀도가 낮게 관찰되었으며, 또한 이 부위에서 미토콘드리아의 변형 양상은 100 ppm 투여군과 유사하였으나 조면소포체는 팽창되거나 붕괴되어 심한 막성 구조의 변화가 관찰되었다(Fig. 11b). 그리고 불소농도 300 ppm 실험군의 법랑모세포는 100 ppm 및 200 ppm 투여군과 비교하였을 때, 미토콘드리아, 조면소포체 등의 세포소기관에 변형은 유사하게 관찰되었으나 특징적으로 이 시기에는 법랑모세포간에 세포막의 유실로 세포소기관 및 세포구성물들이 서로 혼재되어 관찰되었다(Fig. 12b).

고 찰

원래 절치의 법랑모세포는 크게 전분비대, 분비대 및 성숙대의 3단계를 거쳐 성장, 소멸한다(Warshawsky & Smith, 1974; Leblond & Warshawsky, 1979). 전분비대에서는 아직 분비활동에 관여하지 않는 미분화세포들이 주를 이루며, 다시 이 세포들은 치수에 접한 부위와 상아질에 접하는 부위로 나뉜다. 분비대에서는 분화된 법랑모세포들이 미성숙된 법랑기질을 분비하며 법랑모세포에서 Tome's 돌기가 관찰된다. 분비대는 다시 초기 법랑질 분비부위(region of initial enamel secretion), 내법랑질 분비부위(region of inner enamel secretion), 외법랑질 분비부위(region of outer enamel secretion), 말기 법랑질 분비부위(region of final enamel secretion)로 나뉜다.

성숙대에서는 초기에 법랑모세포들의 높이가 줄어들고 1/4에서 1/2정도의 법랑모세포들이 소실되며, 그 이후 법랑모세포들은 평활한 주름진 표면이 2~3회 반복되는 전환양상을 보이다가 착색된다. 성숙대의 법랑모세포는 법랑모세포 전환부위(region of ameloblastic modulation), 법랑모세포 착색부위(region of ameloblastic pigmentation)로 나뉘거나(Leblond & Warshawsky, 1979), 분비 후 이행부위(region of postsecretory transition), 고유성숙부위(region of maturation proper), 착색부위(region of pigmentation), 퇴축 법랑모세포 부위(region of reduced ameloblast)로 나뉜다(Warshawsky & Smith, 1974). 이 때 성숙대의 초기 이행부위를 하나의 독립된 단계로 보는 견해도 있으나(Salama et al., 1991; Smid et al., 1992), 본 실험에서는 성숙대를 하나의 단계로 취급하였다. 본 연구에서 관찰된 원쥐태아 치아기의 조직학적 구성은 전분비대, 분비대 및 성숙대로 관찰되었다. 또한 치아기는 가장 외측으로부터 외법랑상피, 성장세망, 중간층, 법랑모세포층, 법랑기질층, 상아기질층, 치수로 이루어져 있었다. 이러한 조직학적 구성은 다른 종에서 관찰되는 구조들과 동일한 것으로 확인되었다(Ten Cate, 1996).

어미 쥐의 절치를 대상으로 한 연구에서 가역적인 공포를 관찰하였으며, 불소 주입 후 2~16시간 사이에서 법랑모세포의 원심반부에서 어두운 구체를 확인하

였다. 또한 구치 법랑모세포는 교두의 근심면에서 가장 빈번하게 변화한다고 하였다. 기질 침착의 증가율은 상악 구치 교두의 원심면에서 보다 근심면에서 증가하고, 이것은 분비 법랑모세포의 민감도가 기질 생산율과 관계가 있다고 하였다 (Neiman & Eisenmann, 1975). 또한 Ericsson (1966) 및 Ekstrand et al. (1977)의 보고에서 세포변화는 불소 주입 후 1시간 내에 일어났는데, 이러한 빠른 효과는 복강 내 주입 또는 단독 구강투여 후 30분 이내에 최고의 혈중 불소 농도를 관찰한 결과와도 잘 일치된다.

최근 미세구조에 관한 연구에서 Takano & Ozawa (1980)는 미토콘드리아의 팽창과 붕괴 그리고 조면소포체의 팽창과 탈 리보솜화는 불소 주입 후 일어나는 초기 변화로 보고하였고, Susheela & Sharma (1988)도 불소 처리한 토끼의 골세포와 세망적혈구에서도 법랑모세포에서 관찰된 폴리리보솜의 팽창이 확인되었다고 보고한 바 있다. 불소 투여의 농도를 크게 세 단계로 구분하여 수행한 본 실험에서도 불소농도에 따라 법랑모세포의 붕괴 등과 같은 형태적인 변화가 300 ppm에서 가장 현저하게 관찰되었다. 그러나 불소에는 영향을 받았으나 세포의 붕괴 등이 관찰되지 않은 다른 실험군에서는 미토콘드리아 그리고 조면소포체의 구조적인 변형이 확인되었다. 따라서 본 실험에서 관찰된 세포소기관의 변형은 불소 투입 후 법랑모세포에서 일어나는 공통적인 현상이며, 세포손상의 정도를 확인하는 척도임이 확인되었다.

현재까지 보고된 연구의 대부분은 불소에 영향을 받은 세포소기관의 변화를 위에서 언급한 것처럼 미토콘드리아의 팽창, 조면소포체의 팽창과 리보솜의 탈락으로 규정하고 있는데 (Takuma et al., 1983; Salama et al., 1991), 본 실험을 통하여 미토콘드리아의 팽창 이전에 기질내에 라멜라형태의 동심원구조가 형성된 후 미토콘드리아의 팽창과 막성 구조의 유실이 관찰된 것으로 미루어 불소에 영향을 받은 세포변형을 나타내는 미세구조적인 특징으로 미토콘드리아내의 동심원구조의 형성을 또 하나의 형태적 척도로 규정할 수 있을 것이다.

Kruger (1970)는 불소의 농도를 세 단계로 나누어 30분, 60분 그리고 90분의 시간 간격을 두고 법랑모세포의 형태적인 변화를 실험하였는데, 이들의 결과와 비교하면, 다량의 불소 (7 mg F/kg body weight) 투입 후,

30분에는 미세구조적으로 현저한 변화는 없음에도 불구하고 조면소포체의 팽창이 어느 정도 일어나며, 조면소포체의 리보솜이 세포질로 자유 리보솜이 되는 현상이 일어났다고 보고하였다. 그러나 60분까지 이러한 세포내 변화가 관찰되지만, 90분 후에는 조면소포체의 공포화 현상이 전반적으로 일어난다고 하였다.

본 실험에서 고농도인 300 ppm 투여군의 법랑모세포는 전체적으로 심한 변화를 나타내었고, 대부분의 미토콘드리아에서 라멜라 형태의 동심원상 구조가 관찰되었으며, 미토콘드리아의 기질은 붕괴되어 크리스타의 구조가 유실된 채 관찰되었다. 또한 세포질 내에는 조면소포체의 팽창으로 인한 커다란 공포들이 다수 관찰되었고, 대부분 막성 구조가 유실되거나 리보솜이 탈락되어 세포질 내에서 폴리솜 형태로 응집되어 있었다. 그러므로 Kruger (1970)의 고농도 실험군에서 관찰된 세포의 변화와 비교하였을 때, 본 실험에서 사용된 300 ppm의 경우도 비가역적인 손상을 입어 결국 세포의 괴사로 이어진 것으로 사료된다. 또 다른 연구의 경우, 법랑질 형성과정에 방사선이 조사되면 법랑모세포는 키가 큰 원주이었던 형태가 키가 작은 입방형으로 바뀌며, 배열도 불규칙한 것으로 알려져 있다 (Medak et al., 1952). 본 연구에서도 방사선에 조사받은 경우와 같이, 300 ppm 투여군의 경우에 법랑모세포의 배열이 불규칙해졌고, 세포의 형태 변화도 관찰할 수 있었는데, 이러한 결과는 방사선조사뿐만 아니라 고농도의 불소에서도 동일한 영향을 준다는 것을 의미한다.

한편, Kruger (1970)의 보고에서 법랑모세포의 현저한 형태적 변화들은 불소의 중간 단계에서 관찰되었다고 하였다 (3 mg F/kg body weight). 즉, 주입 후 30분 세포 전반적으로 조면소포체의 팽창이 진행되었고, 주입 후 60분까지 이러한 팽창은 존재하지만, 불소를 다량 주입했을 때 진행되었던 리보솜의 탈락에 의한 팽창은 진행되지 않았다. 불소 3mg의 주입 후 90분대에는 정상적인 법랑모세포와 여전히 형태적인 차이점이 있었다. 그러나 미량의 불소 (0.1 mg F/kg body weight)를 사용하였을 때는 법랑모세포의 미세구조의 변형을 구별할 수 없다고 하였다.

본 연구의 경우 중간단계인 200 ppm 투여군에서 미토콘드리아들은 100 ppm 투여군과 비교하였을 때, 기질내에 전자밀도가 높은 라멜라 형태의 구조가 관찰되

었고, 조면소포체의 막성 구조로부터 리보솜이 세포질 내로 탈락되고 분산되어 관찰되었다. 그리고 법랑질과 접해있는 원위부위의 세포구조는 100 ppm 투여군에 비해 보다 정돈된 상태로 관찰되었으나 세포질내의 조면소포체 구조는 팽창과 막성계의 유실로 붕괴가 확인되었다. 따라서 고농도의 불소투여는 법랑모세포의 변화는 직접적이고 영구적이라 생각할 수 있다. 즉 고농도의 불소투여 시 나타나는 법랑모세포의 변화는 세포내 이온균형의 파괴 등 기능적인 장애를 준 것으로 사료된다. 그러나 농도에 따른 불소투여 시 법랑기질에 축적된 불소이온의 양, 유기물질의 변화 등에 관한 연구가 아직 미진한 상태이므로 불소투여 시 칼슘 통로의 변화, mRNA의 변화, DNA의 변화 등에 관한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 2003년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

참 고 문 헌

- Ekstrand J, Alvan G, Boreus LO, Norlin A: Pharmacokinetics of fluoride in man after single and multiple oral doses. *Eur J Clin Pharm* 12 : 311 317, 1977.
- Ericsson Y: Blood fluoride clearance in rats differing in age or previous fluoride exposure. *Acta Odontol Scand* 24 : 393 404, 1966.
- Gartner LP, Hiatt JL, Provenza DV: Effects of ionizing radiation on incisor development of the prenatal mouse. *Acta Anat* 98 : 367 375, 1977
- Hammarström L: Distribution in developing rat enamel of simultaneously injected fluoride and calcium. *Scand J Dent Res* 79 : 369 376, 1971.
- Josephsen K, Fejerskov O: Ameloblast modulation in the maturation zone of the rat incisor enamel organ. A light and electron microscopic study. *J Anat* 124(1) : 45 70, 1977.
- Kruger BJ: The effect of different levels of fluoride on the ultrastructure of ameloblasts on the rat. *Arch Oral Biol* 15 : 109 114, 1970.
- Leblond CP, Warshawsky H: Dynamics of enamel formation in the rat incisor tooth. *J Dent Res* 58(B) : 950 975, 1979.
- Lindvall AM, Omnell KA, Schildt BE: The effect of roentgen irradiation on the formation of enamel and dentin in maxillary rat incisors. *Scand J Dent Res* 80 : 253 263, 1972.
- Marthaler TM: Fluoride supplements for systemic effects in caries prevention. In *Continuing evaluation of the use of fluorides*, eds. Westview Press, pp. 33 37, 1979.
- Medak H, Schour I, Klaube WA: The effect of single doses of irradiation upon the tissues of the upper rat incisor. *J Dent Res* 31 : 559 574, 1952.
- Neiman A, Eisenmann DR: The effect of strontium, cobalt and fluoride on rat incisor enamel formation. *Anat Rec* 183 : 303 322, 1975.
- Salama AH, Zaki AE, Eisenmann DR: Fine structural changes and lysosomal phosphatase cytochemistry of ameloblasts associated with the transitional stage of enamel formation in the rat incisor. *Am J Anat*. 190 : 279 290, 1991.
- Smid JR, Monsour PA, Rousseau EM, Young WG: Cytochemical localization of dipeptidyl peptidase II activity in rat incisor tooth ameloblasts. *Anat Rec* 233 : 493 503, 1992.
- Susheela AK, Sharma K: Fluoride induced changes in tooth glycosaminoglycans in vivo study in the rabbit. *Arch Toxicol* 62 : 328 330, 1988.
- Takano Y, Ozawa H: Ultrastructural and cytochemical observations on the alternation morphologic changes of the ameloblasts at the stage of enamel maturation. *Arch Histol Jpn* 43 : 385 399, 1980.
- Takuma S, Furui A, Tomoda F, Ogiwara H, Kumamoto Y, Yanagisawa T: Ultrastructural studies of disturbances in amelogenesis induced in rat incisors by fluoride and strontium administration. In *Mechanisms of Tooth Enamel Formation*, ed. Suga, Quintessence, pp. 259 272, 1983.
- Ten Cate AR: *Oral histology: Development, structure, and function*. Mosby Year Book, Inc., pp. 218 256, 1996.
- Warshawsky H, Smith CE: Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat Rec* 179 : 423 446, 1974.

<국문초록>

불소 투여가 백서태아 발육에 따른 법랑질형성 과정에

미치는 영향을 알아보기 위하여 임신한 어미흰쥐에 대조군은 증류수만을 음용시켰고, 실험군은 100, 200 및 300 ppm의 불소가 함유된 음용수를 투여하였다. 이후, 생후 11일 된 어린 흰쥐를 희생하였고, 하악절치를 발치하여 법랑질형성 동안에 일어나는 법랑모세포의 형태 및 구조적 변화를 광학현미경과 투과전자현미경으로 관찰하였다. 흰쥐태아 치아기의 조직학적 구성은 전분비대, 분비대 및 성숙대로 관찰되었으며, 특히 성숙대의 법랑질에서 물과 유기물을 선택적으로 제거하는 평탄끝법랑모세포(smooth ended ameloblast)와 무기이온을 추가로 공급하는 주름끝법랑모세포(ruffle ended ameloblast)가 관찰되었다. 또한 치아기는 가장 외측으로부터 외법랑상피, 성상세막, 중간층, 법랑모세포층, 법랑기질층, 상아기질층, 치수로 이루어져 있었다.

이러한 조직학적 구성은 백서태아에서도 성체에서 관찰되는 구조들과 동일한 것으로 확인되었다. 한편, 불소투여군에서 각 대(zone)의 법랑모세포들은 구조적 및 형태적인 변화가 확인되었는데, 조면세포체가 공포화되고 막성계의 유실로 붕괴되었으며, 라멜라 형태인 동심원상의 평운된 구조가 미토콘드리아의 기질에서 관찰되었다. 특히 고농도 실험군인 300ppm투여군에서 법랑모세포사이에 세포막이 유실된 세포들이 관찰되었다. 그러므로 임신중인 흰쥐에 투여된 불소는 흰쥐태아의 치아발육과정 중 법랑질형성에 관여하는 법랑모세포에 영향을 미쳐 전환주기에 변화를 주고 법랑모세포의 미세구조적 변화와 형태적인 변화를 초래하였다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1a.** Photomicrograph of control presecretory zone stained by modified multiple stain. This layer consists of cuboidal type cells and shows the beginning of ameloblast differentiation ($\times 200$).
- Fig. 1b.** Electron micrographs of control presecretory zone. The nucleus is oval shape and organelles to be little.
- Fig. 2a.** After injection of 100 ppm fluoride, region of presecretory zone. Longitudinal section in the region of ameloblasts facing pulp posterior portion ($\times 200$).
- Fig. 2b.** Presecretory zone cells after injection of 100 ppm fluoride. Damaged cells that have dark cytoplasm between the other ameloblast.
- Fig. 3a.** After injection of 200 ppm fluoride, region of presecretory zone. The ameloblasts remain poorly differentiated ($\times 200$).
- Fig. 3b.** Electron micrographs of ameloblast in presecretory zone after injection of 200 ppm fluoride. Showed the distension of the rough surfaced endoplasmic reticulum and extruded mitochondria.
- Fig. 4a.** After injection of 300 ppm fluoride, region of presecretory zone ($\times 200$).
- Fig. 4b.** Electron micrographs of presecretory zone after injection of 300 ppm fluoride. Injured cells have dark cytoplasm between the other ameloblast.
- Fig. 5a.** Photomicrograph of control secretory zone. The ameloblasts are more differentiated than presecrting cells. The interdigitating portions of the process have not yet developed ($\times 200$).
- Fig. 5b.** Electron micrographs of control secretory zone. The nucleus are almost oval shaped. The oval shaped nucleus is located in basal cytoplasm.
- Fig. 6a.** After injection of 100 ppm fluoride, region of secretory zone. A thin layer of lightly stained initial enamel defines the dentin enamel junction ($\times 200$).
- Fig. 6b.** Electron micrographs of ameloblast in secretory zone after injection of 100 ppm fluoride. Columnar shaped nucleus and numerous mitochondria are observed in basal cytoplasm.
- Fig. 7a.** After injection of 200 ppm fluoride, region of secretory zone. Ameloblasts are long columnar cell. The cells are taller, the nuclei are still in two staggered levels and Tome's processes are characteristically arranged in picket fence configuration ($\times 200$).
- Fig. 7b.** Cytoplasm of ameloblast in secretory zone after injection of 200 ppm fluoride. The cytoplasm contains numerous mitochondria near the nucleus.
- Fig. 8a.** After injection of 300 ppm fluoride, region of secretory zone. Especially, Tome's processes are arranged into enamel matrix ($\times 200$).
- Fig. 8b.** Transmission electron micrographs of ameloblast in secretory zone after injection of 300 ppm fluoride. Polysome like structure of free ribosome is observed near the nucleus.
- Fig. 9a.** Photomicrograph of control maturation zone. The ameloblasts are reduced in height, but two staggered levels of nuclei are persisting. The apical surface of ameloblasts is relatively smooth ($\times 200$). sAB: smooth-ended ameloblast, rAB: ruffle-ended ameloblast
- Fig. 9b.** Transmission electron micrographs of ameloblasts in control maturation zone. Cell surface was ruffled and contains numerous mitochondria.
- Fig. 10a.** After injection of 100 ppm fluoride, region of maturation zone. Large intracellular space separates adjacent ameloblasts ($\times 200$).
- Fig. 10b.** Cytoplasm of ameloblast in maturation zone after injection of 100 ppm fluoride. Nucleus of ameloblasts are elongated shape and ameloblast contain large vacuoles.
- Fig. 11a.** After injection of 200 ppm fluoride, region of maturation zone ($\times 200$).
- Fig. 11b.** Transmission electron micrographs of ameloblast cytoplasm after injection of 200 ppm fluoride in maturation zone. Most ameloblasts show severe changes in their distal cytoplasm.
- Fig. 12a.** After injection of 300 ppm fluoride, region of maturation zone. The ameloblasts are remarkably reduced in height and number ($\times 200$).
- Fig. 12b.** Cytoplasm of ameloblast after injection of 300 ppm fluoride in maturation zone. The cytoplasm is dominated by severely changed endoplasmic reticulum and mitochondria.





