구치부 치관삭제가 생쥐 해마복합체에 미치는 영향에 관한 조직학적 연구

조선대학교 치과대학 보철학 교실

김용철·강동완

Ⅰ. 서 론

최근에 사람의 노화 원인에 관한 관심이 높아지면서 치아상실에 따른 저작 행위의 감소나 저작 기능의 저하가 사람과 실험동물의 노화 과정을 유발하는 전신 인자로 작용 할 가능성이 있다는 연구 결과들이 보고되고 있다[1,2,3,4]. Onozuka 등[5]은 양전자 방출 단층촬영술과 자기 공명 영상 을 이용한 분석에서 저작 활동이 대뇌 피질의 여러 부위에 있는 신경세포 활동을 증진시킨다는 연구 결과를 보고하였는데, 이 결과는 저작활동에 장애가 생기면 신경세포의 활동이 저하 될 수도 있음을 의미한다.

Hujisawa 등[6]은 백서를 이용한 동물실험에서 편측으로 저작하면 좌우측 대뇌 반구의 신경세포의 밀도가 차이가 난다고 하였으며, Kato 등[7]은 어린 쥐에서 치아가 상실되면 일정기간 성장 후에 공간 기억의 손상이 초래되어 행동 양상이 변화한다고 하였고, Kawamura[8]는 이유시기부터 유동식을 통하여 저작활동이 감소되면 회피 행동의 손상이 초래된다고 하는 등의 저작활동과 뇌 그리고 행동의 변화와 관련된 다양한 연구 결과들을 보고하였다.

사람의 뇌에서 학습과 기억을 담당하는 주된 영역으로는 해마 복합체(hippocampus, hippocampal formation)가 있다. 해마 복합체는 사람 뇌에서 측두엽의 안쪽에 위치하며, 해마 신경세포는 자기상승작용과 같은 신경계의 활성에 따라서 신경 연접의 기능적 변화를 나타낸다. 또한, 해마 복합체는 대뇌 피질을 따라서 퍼지는 발작과 관련한 변화가 시작되는 곳으로 알려져 있으며, 해마복합체의 신경세포의 손상은 학습과 공간 기억 능력의 변화에도 영향을 미치는 것으로 생각되고 있다[9].

대뇌에서도 혈액을 통하여 신경세포에 산소와 글루코스를 공급하고 노폐물과 이산화탄소를 제거하게 되는데, 다른 세포들에 비하여 특히 해마 복합체의 신경세포는 산소 부족에 대단히 취약한 구조로 알려져 있다[10]. Makiura 등[11]은 혈관성 치매를 나타내는 환자와 동일한 조직병리학적 양태 및 생화학적 이상을 나타내기 때문에 혈관성치매를 연구하는 모델로 널리 이용되는 Stroke-Prone Spontaneously Hypersensitive Rats (SHRSPs)를 이용한 실험에서 대뇌 혈류량이 감소하면 학습과 기억능력이이 저하되는 경향을 보인다고 하였다. 또한, Senda 등[12]은 껌과 캔디를 계속 사용하게 하는 실험을 통하여 저작 활동을 통하여 뇌의 혈류량이 증가한다고 하였고, Monose 등[13]은 저작기능이 현저히 감소하면 뇌 혈류량의 감소가 수반된다고 하여 저작활동과 중추 신경계 혈류량 변화사이에 상관관계가 있음을 보고하였다. 그러나, 이러한 최근의 연구

*이 논문은 2002년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음

결과들에도 불구하고 아직까지 저작행위의 감소와 같은 치아의 기능저하가 뇌의 기능과 관련한 신경세포의 변화에 미치는 영향을 세포조직학적 및 면역 조직화학적으로 규명한 연구는 미미한 실정이다.

본 연구에서는 저작 행위의 감소가 중추신경계의 해마복합체에 미치는 조직학적 변화를 알아보기 위하여, 생쥐의 대구치 치관부를 삭제를 통하여 저작행위의 감소 상태를 유도한 후 해마복합체의 조직절편을 제작하여 형태학적 분석과 해마 복합체에서 뇌의 발생과 신경세포의 기능에 영향을 미치는 것으로 보고된 glial fibrillary acidic protein (GFAP)의 발현을 면역 조직화학적으로 연구하였다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 실험 동물

출생 10개월 된 노령의 생쥐 39마리를 실험에 이용하였다. 생쥐 24마리는 에테르 흡입마취 후 염산 케타민(Ketamine HCL, 150mg/kg, 유한양행)으로 복강내 주사하여 전신 마취 시킨 다음 치과용 엔진과 바(bur)를 이용하여 상악 구치들을 모두 치은 변연부 까지 삭제하였다. 삭제 후 대조-I, -II, -III 군으로 나누어 각 각 수술 후 1주, 2주, 3주 동안 더 사육하였다. 대조군 생쥐 15마리는 대조-I, -II, -III군으로 치아는 삭제하지 않고 마취 등의 동일한 수술전 과정(sham operation)만 거친 후 5마리 씩 구치삭제-I, -II, -III군과 동일 기간 사육하였다. 사육기간 동안 생쥐들은 표준 생쥐 고형사료 (Oriental East Co., LTD., Tokyo, Japan)와 증류수를 섭취 시켰다.

2. 조직표본 제작

대조-I, -II, -III군과 구치삭제-I,-II,-III군의 생쥐들을 모두 4% paraformaldehyde을 포함하는 0.1 M phosphate-buffered saline(PBS)으로 관류 고정하였다. 뇌 조직을 적출 하여 4℃, 4% paraformaldehyde와 4% sucrose 용액에서 16시간 고정한 후 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 2시간 세척하고, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV 알코올로 각각 12시간씩 탈수하였다. 클로로포름 용액에서 4회 2시간씩 처리한 후 통법에 따라 파라핀에 포매 하였다. 전정에서 2.46 mm 후방 정도의 관상 절편을 5 μm 두께로 ethoxysilran이 코팅된 슬라이드에 붙인 후 실온에서 20분간 건조 한 후 Hematoxylin-Eosin 염색과 면역 조직화학적 염색에 이용하였다.

3. 면역조직화학적 염색

생쥐 해마복합체의 관상절편을 0.25% Triton X-100을 포함하는 PBS로 5분간 처리 한 후 PBS로 3번 더 세척하였다. 절편을 10% 정상염소혈청을 포함하는 PBS로 37℃에서 30분동안 전처리를 하고, 1% 정상염소혈청을 포함하는 PBS에 1차항체를 희석하여 4℃에서 24-48시간 동안 반응하였다. 1차 항체는 mouse anti-Glial fibrillary Acidic Protein(GFAP) (1:100) (Komabiotech)를 이용하여 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 2차 항체는 Biotinylated secondary antibody (goat anti-mouse IgG antibody, Vector Lab)를 반응액에 1:20으로 희석하여 실온에서 30분 동안 반응하였다. PBS로 세척하고 avidine-biotin-peroxidase complex(Vector Lab)를 PBS에 1:200으로 희석하여 실온에서 30분간 반응시키고 0.05% DAB(diamonobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색하였다. Hematoxylin으로 대조 염색하고 절편을 Permount(Fisher)로 봉입하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

4. 세포수 산정 및 통계처리

GFAP가 염색된 세포의 수는 각 각 20개의 슬라이드 표본에서 CA1의 AI과 AII 영역을 중심으로 광학현미경의 배율 200배에서 계산하였다. 통계학적 유의성 검사는 ANOVA와 Scheff'e 분석을 이용하였다($p=0.01$).

Ⅲ. 실험 결과

1. Hematoxylin-Eosin 염색 소견

해마 복합체는 CA1(cornu ammonis1), CA3, CA4와 치아이랑(dentate gyrus: DG) 영역으로 구분할 수 있었다. 해마뿔은 C자를 뒤집어놓은 모양을 하고 있었으며 이행층(stratum oriens), 피라밋층(stratum pyramidal layer), 부챗살층(stratum radiatum), 구멍층(stratum lacunosum), 분자층(stratum moleculare)으로 구분되었다(Fig. 1, 2). 치아이랑(DG)은 U자 모양으로 CA4 구역에 채워져 있고 분자층(molecular layer) 및 과립층(granulae layer) 그리고 다형층(polymorphic layer)으로 구성되어있었다. CA1 영역과 치아이랑 영역에서 피라밋층의 세포들의 숫자가 대조군에 비하여 구치삭제군에서 다소 감소하는 소견을 보였다. CA1과 치아이랑 영역을 제외한 다른 영역에서는 대조군과 구치삭제군사이의 해마 표본의 뚜렷한 형태학적 차이는 관찰되지 않았다

2. GFAP 면역조직화학적 염색 소견

GFAP는 모든 군의 CA1 영역과 DG 영역에서 그 발현이 관찰되었으나, 상대적으로 대조군 보다 구치삭제군에서 GFAP 발현이 증가하는 소견을 보였다(Fig. 2). 특히 CA1 영역에서 GFAP의 발현이 증대되었으며 1주, 2주 및 3주로 시간이 경과할수록 GFAP를 발현하는 세포의 수가 증가하고 세포의 비대화 현상 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 3).

Ⅳ. 총괄 및 고안

최근에 저작과 뇌 기능의 변화와의 관계를 연구하기 위하여 저작 행위를 감소를 유도하는 방법으로는 실험 동물의 구치를 삭제하여 치아의 기능 저하를 유도하는 방법과 soft-det와 같은 식이 조작에 의하여 저작력의 감소를 유도하는 방법들이 널리 이용되고 있다[14,15,16,17]. 구치삭제에 의한 저작행위 감소 유도 후 water maze learning과 같은 심리학적 방법으로 실험 동물의 학습과 기억력의 변화를 평가하는 연구 결과들이 최근에 보고되고 있으며[18,19,20], 식이 조작 후 하악과두나 교근의 조직형태학적 변화뿐만 아니라 뇌 조직의 조직학적 변화를 관찰한 연구 결과도 있다[21,22,23,24]. 또한, 노화나 기능저하 현상이 성장인자와 신경전달 경로의 분자 요소 그리고 세포골격 단백질의 아주 적은 발현의 차이에 의해서도 초래될 수 있음을 시사하는 연구 결과[25]가 알려짐에 따라 노화 과정에서 나타나는 변화를 명확히 확인하기 위하여 노화 현상을 촉진시킨 senescence



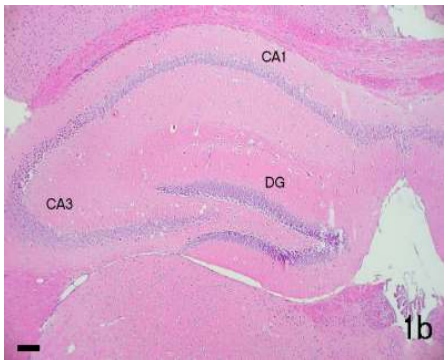

Fig. 1. Hematoxylin and Eosin staining of the hippocampal formation.
a, control-I group mouse, 1 week after sham operation. b, molarless-I group mouse, 1 week after operation. CA; cornu ammonis, DG; dentate gyrus. scale bar = 50 μm.

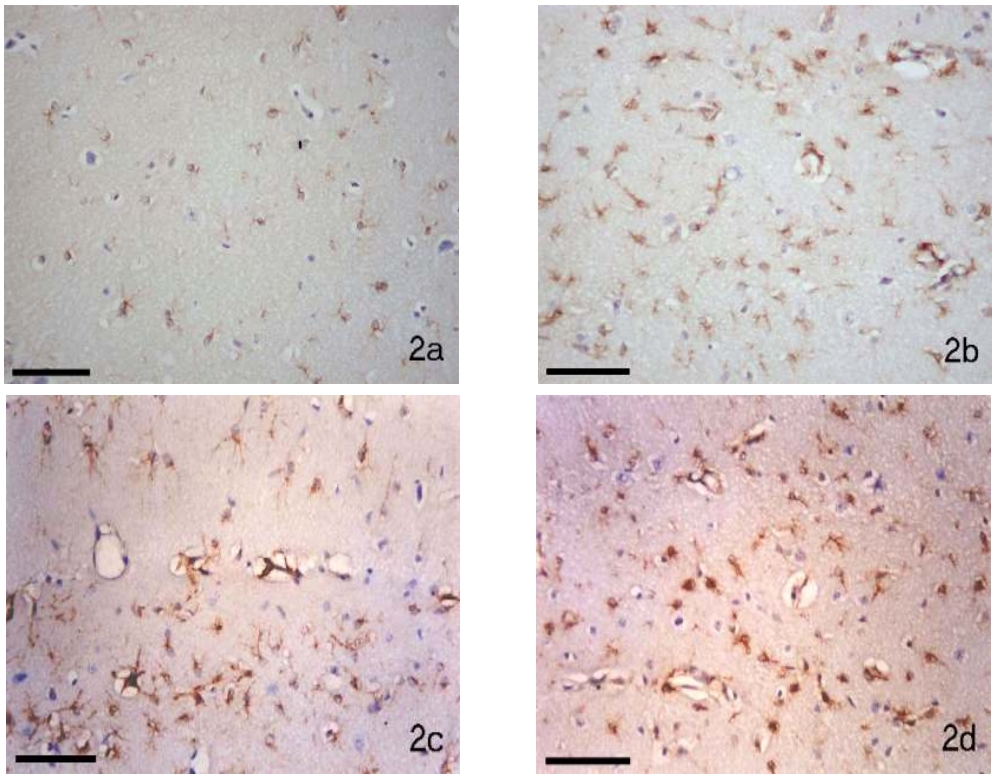

Fig. 2. GFAP immunohistochemistry in the CA1 subfield. a, control-I group mouse. b, molarless-I group mouse. c, molarless-II group mouse. d, molarless-III group mouse. In this group, the GFAP-labeled cell were more strongly stained throughout the CA1 subfield than other groups, and cellular hypertrophy was often seen. scale bar = 50 μm.

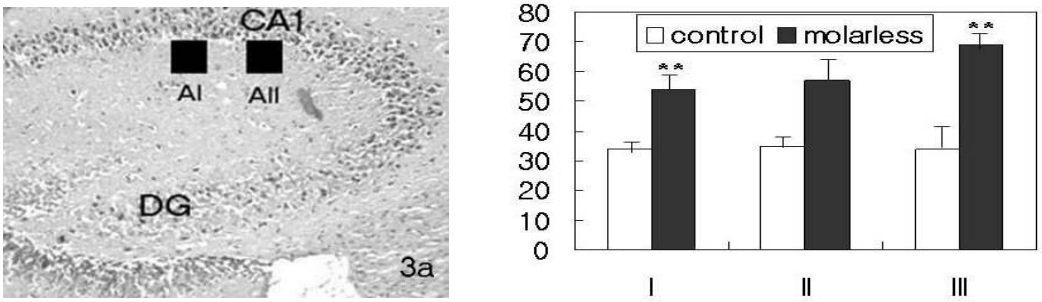

Fig. 3. Density of GFAP-labelled cells within the CA1 region of the hippocampal formation. Schematic representation of a frontal section of the hippocampal formation showing the areas (zone AI, AII) used for quantification. Effect of the length of period of the molarless condition on the result in the immunohistochemical localization of GFAP in the CA1 subfield of the hippocampal formation. Each value represents the mean±S.D.(n=20 for each group, two sections were used per animal). **p<0.01 compared to corresponding region of control mice using .ANOVA followed by Scheff'e analysis.

-accelerated mouse (SAM)이나 accelerated senescence-prone mouse (SAMP8)도 복합 사용되고 있다[26,27].

본 연구에서는 저작행위 감소로 유발된 해마복합체의 조직학적 변화를 명확히 관찰하기 위하여 생후 10개월로 노령의 특성을 잘 나타내는 생쥐들을 실험에 이용하였다. 저작 행위의 감소 유도는 상악구치를 모두 절제하는 방법을 사용하였으며 뇌의 해마 복합체의 변화를 광학현미경을 이용한 형태학적 분석뿐만 아니라 다양한 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 통하여 저작력의 변화와 해마복합체의 세포변화와 관련한 세포생물학적 기전을 이해하고자 하였다.

Onozuka 등[28]은 SAMP8 생쥐를 이용한 형태학적 연구에서 구치를 삭제한 생쥐에서 학습 능력이 저하되었는데 이는 해마 복합체 CA1 영역의 신경세포 밀도 감소와 관련되는 결과라고 하였다. 본 연구에서는 대조군에 비하여 구치삭제 군에서 구치 삭제 후 1주, 2주, 3주로 시간이 경과함에 따라 CA1 영역에서 보다 DG 영역에서 신경세포의 수와 밀도가 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 저작행위의 감소에 따라 해마복합체의 신경세포의 수와 밀도는 대체로 감소하나 그 변화 영역은 실험 동물의 조건에 따라 다른데서 기인한 것으로 해석 할 수 있다.

GFAP는 다발 형태로 존재하는 중간세사의 일종으로 뇌조직의 간질세포인 별아교세포(astrocyte)에 정상적으로 발현되는 물질로서 그 분포와 뇌조직의 노화 현상 등과의 연관성에 관하여 최근에 널리 연구되고 있다[19,28]. Watanabe 등[27]은 SAMP8 생쥐에서 대구치의 상실이 학습능력을 감소시키고 해마복합체의 CA1 영역의 신경세포의 수를 감소시키며, GFAP 면역 염색된 별아교세포의 비대화를 촉진하였는데, 이 과정은 연령의 증가와 상관관계를 나타낸다고 하였다. 또한, 중추신경계의 신경 손상의 결과로 별아교세포는 비대와 증식 변화를 포함한 나타내는 신경교화의 소견을 보이게 되며, 연령 증가에 따른 뇌 기능 저하에 따라 별아교세포의 GFAP의 함량은 증가하고 비대화 소견도 나타난다고 하여 신경 손상과 GFAP 발현과의 관련성을 보고하였다. 본 실험에서도 대조군에 비하여 구치삭제-II군과 구치삭제-III군에서 GFAP 면역 염색된 세포가 해마복합체의 CA1 영역에서 통계학적으로 유의하게 증가하고 세포가 비대화의 소견을 나타내었다. 이 결과는 CA1 영역의 별아교세포의 수의 증가는 해마복합체의 신경세포의 감소와는 별도로 신경교 세포인 별아교세포가 저작행위의 감소의 결과로 증가한 것으로 해석할 수 있으며, 이는 또한 대다수의 다른 연구자들[19,27,28]의 연구 결과와도 일치한다. 그러나 Smith 등[25]에 의하면 연령 증가에 따른 기능 저하 현상이 해마복합체에서 신경세포의 감소 현상 없이 나타날 수 있으며, 발육 단계에서도 연령 증가에 따라 GFAP발현이 다소 증가하지만 GFAP의 증가와 공간 학습능력의 차이가 연관성을 갖는다고 평가하기는 어렵다고 하였다. 본 연구에서도 정상 발육 상태와는 다르게 저작 행위의 감소에 따른 GFAP 면역 염색된 별아교세포의 수가 통계학적으로 유의성 있게 증가하였으나, 이 결과를 뇌의 기능저하에 의한 직접적인 결과로 해석하기 위해서는 향후 뇌 기능저하와 별아교세포 그리고 GFAP 발현에 관한 상관성을 분자생물학적 관점에서 보다 보완하는 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

뇌 조직의 세포외 기질은 하이아루론산과 프로테오글리칸 그리고 tenascin으로 구성되어 있으며, 다른 조직들과는 다르게 교원질이나 fibronectin과 같은 물질은 존재하지 않는다[29,30]. 뇌조직의 여러 세포외 기질 가운데서도 tenascin-c는 α8β1 세포표면 복합 수용체와 상호작용을 통하여 신경세포의 발생과정 특히 신경세포의 axon guidance에 중요한 역할을 하며 정상적으로 해마 복합체의 치아이랑의 분자층에 존재하는 것으로 알려져 있다[31].

본 연구의 결과에서 구치부 치관 삭제에 따른 저작행위의 감소에 따라 생쥐 해마 복합체의 신경세포의 수와 별아교세포의 GFAP의 발현 양상 및 형태 변화가 관찰되는 것으로 보아 저작행위의 감소가 해마 복합체의 세포조직학적인 변화를 유발하는 것으로 해석 할 수 있다. 그러나 저작 행위의 감소와 해마 복합체의 기능인 학습과

기억의 상관관계를 이해하기 위해서는 향후 다양한 보완 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

저작 행위의 감소가 중추신경계의 해마복합체에 미치는 조직학적 변화를 알아보기 위하여, 생쥐의 대구치 치관부를 삭제를 통하여 저작행위의 감소 상태를 유도한 후 생쥐의 해마 복합체에서 조직학적 관찰과 GFAP 단백질의 발현을 면역 조직화학적으로 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1 H-E 염색 표본에서 CA1 영역과 치아이랑 영역에서 피라밋 층의 세포의 수가 대조군에 비하여 구치삭제군에서 감소하는 소견을 보였다.

2. GFAP는 구치삭제군의 CA1 영역에서 대조군에 비하여 GFAP의 발현 이 증대되었으며 치아삭제 후 1주, 2주 및 3주로 시간이 경과할수록 GFAP를 발현 하는 세포의 수가 증가하였다.

참 고 문 헌

1. Isse K, Kanamori M, Uchiyama M. A case-control study of risk factors associated with alzheimer type dementia in Japan. In: studies in Alzheimer disease: Epidemiology and Risk factors. Edited by Satoshi. National center of Neurology and Psychiatry, Tokyo. pp. 63-67, 1991
2. Kang H, Sun LD, Atkins CM. An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term Memory. Cell 2001;106: 71-783.
3. Kondo K, Niino M, Shido K. A case control study of Alzheimer's disease in Japan: significance of life-styles. Dementia 1995;5:314-326.
4. Nishiura H, Tabata T, Watanabe M. Response properties of slowly and rapidly adapting periodontal mechanosensitive neurons in the primary somato-sensory cortex of the cat. Arch Oral Biol 2000; 45:833-842.
5. Sulliven AM, Reynolds DS, Thomas KL. Cortical induction of c-fos by interastriatal endothelin-1 is mediated vis NMDA receptors. Neuroreport 1996;8: 11-216.
6. Fujisawa H. The effect of mastication on post-natal development of the rat brain with a histological and behavioral study. J Jpn Oral Biol 1990;32:495-508.
7. Kato T, Usami T, Noda Y, Hasegawa M, Ueda M, Nabeshima T. The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. Behav Res 1997;83: 39-242.
8. Kawamura S. The effect of food consistency on conditioned avoidance response in mice and rats. J Jpn Oral Biol 1993; 9:227-237.
9. Amaral DG, Witter MP, The rat nervous system. In: hippocampal formation. Academic press, pp.443-93, 1995.
10. Yamashita K, Kataoka Y, Niwa M. Increased production of endothelins in the hippocampus of stroke-prone spontaneously hypertensive rats following transient forebrain ischemia: histochemical evidence. Cell Mol Neurobiol 1993;13:15-23.
11. Makiura T, Ikeeda Y, Hirai T. Influence of diet and occlusal support on learning memory in rats behavioral and biochemical studies. Res Comm Mol Pathol Pharmacol 2000;107:269-277.
12. Senda M, Ishiyama N, Ishii K. Changes in regional cerebral blood flow during mastication in young and old normal subjects measured with positronemission tomography. J Mastication & Health Society 1992;2:49-54.
13. Monose I, Nishikawa J, Watanabe Y. Effect of mastication on regional cerebral blood flow in humans examined by positron on regional cerebral blood flow in humans examined by positron emission tomography with ^{15}O-labelled water and magnetic resonance imaging. Arch Oral Biol 1997;42:57-61.
14. Hinton RJ, Carlson DS. Response of the mandibular joint to loss of incisal function in the rat. Acta Anat 1986;125:145-151.
15. Hinton RJ. Effect of dietary consistency on matrix synthesis and composition in the rat condylar cartilage. Acta Anat 1993;147:97-104.
16. Li J, Shen H, Naus C. Upregulation of gap junction connexin 32 with epileptiform activity in isolated mouse hippocampus. Neuroscience 2001;105:589-598.
17. Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus

space and memory. Brain Science 1979;2:313-365.
18. Hidehiko S, Anthony HF. Cholera toxin is found in detergent-insoluble rafts/domains at the cell surface of hippocampal neurons but is internalized via a raft-independent mechanism. J Biol Chem 2001;276: 182-9188.
19. Oozuka M, Watanabe K, Mirbod SM. Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. Brain Res 1999;826:148-153.
20. Willmott NJ, Wong K, Strong AJ. Intercellualr Ca^{2+} waves in rat hippocampal slice and dissociated glial-neuron cultures mediated by nitric oxide. FEBS 2000;487:239-347.
21. Salo LA, Hoyland J, Ayad S. The expression of types X and VI collagen and fibrillin in rat mandibular condylar cartilage: Response to mastication forces. Acta Odontol Scand 1996;54:295-302.
22. Sasaguri K, Jiang H, Chen J. The effect of altered functional forces on the expression of bone-matrix proteins in developing mouse mandibular condyle. Archs Oral Biol 1998;43:83-92.
23. Smith DM, Mclachlan KR, Mccall WD. A numerical model of temporomandibular joint loading. J Dent Res 1986; 65:1046-1052.
24. Yamada K. Kimmel DB. The effect of dietary consistency on bone mass and turnover in the growing rat mandible. Archs Oral Biol 1991;36:129-138.
25. Smith DR, Hoyt EC, Gallagher M. Effect of age and cognitive status on basal level AP-1 activity in rat hippocampus. Neurobiol Aging 2001;22:773-786.
26. Yamashita K, Kataoka Y, sokurai- Yamashita Y. Involvement of glial Endothelin/Nitric Oxide in delayed neuronal death of rat hippocampus after transient forebrain ischemia. Cell Mol Neurobiol 2000;20: 541-551.
27. Watanabe K, Tonosajas K, Kawase T. Evidence for involvement of dysfunctional teeth in the senile process in the hippocampus of SAMP8 mice. Exp Gerontol 2001;36:283-295.
28. Oozuka M, Watanabe K, Nagasaki S. Impirment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice. Behav Brain Res 2000;108:145-155.
29. Drew GM, Christine MC, Abraham WC. Effects of endothelin-1 on hippocampal synaptic plasticity. Neuro Report 1998;9:1827-1830.
30. Zhow XH, Brakebusch C, Matthies H. Neurocan is dispensable for brain development. Mol Cell Biol 2001;21:5970-5978.
31. Schuster T, Krug M, Stalder M. Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM-associated polysialic acid, beta-1 integrin and the extracellular matrix molecule Tenascin-R in synpses of the adult aat hippocampus. J Neurobiol 2001;49:142-158.

Correspondence to : Dong Wan Kang,D.D.S,Ph.D.
Department of Prosthodontics and Institute of Oral Biology, College of Dentistry,
Chosun University, Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju, 501-759, Korea
dwkang@chosun.ac.kr

- ABSTRACT -

Influence of Molarless Condition on the Hippocampal Formation in Mouse: a Histological Study

Yong-Chul Kim, D,D,S., Ph.D., Dong-Wan Kang, D,D,S., Ph.D.

Department of Prothodontics, College of Dentistry, Chosun University

The decrease of masticatory function caused by tooth loss leads to a decrease of cerebral blood flow volume resulting in impairment of cognitive function and learning memory disorder. However, the reduced mastication-mediated morphological alteration in the central nervous system (CNS) responsible for senile deficit of cognition, learning and memory has not been well documented. In this study, the effect of the loss of the molar teeth (molarless condition) on the hippocampal expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) protein was studied by immunohistochemical techniques.

The results were as follows :

1. The molarless mice showed a lower density of pyramidal cells in the cornu ammonis 1 (CA1) and dentate gyrus (DG) region of the hippocampus than control mice.
2. Immunohistochemical analysis showed that the molarless condition enhanced the time-dependent increase in the cell density and hypertrophy of GFAP immunoreactivity in the CA1 region of the hippocampus.

The molarless condition enhanced an time-dependent decrease in the number of neurons in the hippocampal formation and the time-dependent increase in the number and hypertrophy of GFAP-labeled cells in the same region. The data suggest a possible link between reduced mastication and histological changes in hippocampal formation that may be one risk factor for senile impairment of cognitive function and spatial learning memory.

Key words: molarless condition, brain, hippocampal formation, immunohistochemistry, neuron