creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000239390

2010년 2월

박사학위 논문

생쥐 치아발생과정 중 상아모세포에서 Dynamin II의 발현

조선대학교 대학원

치의학과

오 종 화

생쥐 치아발생과정 중 상아모세포에서 Dynamin II의 발현

Expression of Dynamin II in odontoblast during mouse tooth development

2010년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

오 종 화

생쥐 치아발생과정 중 상아모세포에서 Dynamin II의 발현

지도교수 김 진 수

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2009년 10월 일

조선대학교 대학원

치의학과

오 종 화

오종화의 박사학위논문을 인준함

위원장	전남대학교 교수	강 병 철 인
위 원	조선대학교 교수	김 재 덕 인
위 원	조선대학교 교수	국 중 기 인
위 원	조선대학교 교수	정 문 진 인
위 원	조선대학교 교수	김 진 수 인

2009년 12월

조선대학교 대학원

목 차

도목차 ····· ii
ABSTRACT ····· iii
I. 서 론 ····· 1
II. 실험재료 및 방법 ····· 3
1. MDPC-23 세포의 배양 및 유도 ····· 3
2. 역전사중합효소반응(RT-PCR) ····· 3
3. 면역화학적 단백질 검출법(Western blotting) ····· 4
4. 조직표본 제작 ····· 4
5. 면역조직화학적염색(Immunohistochemistry) ····· 5
6. 통계분석 ····· 6
III. 실험결과 ····· 7
IV. 총괄 및 고안 ····· 9
V. 결 론 ····· 12

참고문헌 ····· 13
사진부도설명 ····· 17
사진부도 ····· 20

도 목 차

Figure 1. Dynamin II mRNA expression in MDPC-23 cells during differentiation ····· 20

Figure 2. Dynamin II protein expression in MDPC-23 cells during differentiation ····· 21

Figure 3. Immunohistochemistry for Dynamin II at early bell stage ····· 22

Figure 4. Immunohistochemistry for Dynamin II at advanced bell stage ····· 22

Figure 5. Immunohistochemistry for Dynamin II at crown and functional stage ····· 23

Figure 6. Measurement of length and Dynamin II protein intensity in odontoblast during tooth development ····· 24

Figure 7. The diagram for altering length of odontoblast and expression intensity and localization of Dynamin II in odontoblast during tooth development ····· 25

ABSTRACT

Expression of Dynamin II in odontoblast during mouse tooth development

Oh Jong Hwa D.D.S., M.S.D.
Advisor : Prof. Kim Jin-Soo D.D.S., M.S.D., PhD.
Department of Dental Science,
Graduate School of Chosun University

The Dynamin II was known as a GTPase protein and it has been contributed a variety of vesicular budding events such as endocytotic membrane fission, caveolae internalization and protein trafficking in the Golgi apparatus. The tooth development proceeds sequentially bud, cap and bell stage. Odontobalsts exhibit a tall columnar shape and establish a continuous single layer with a clear epithelioid appearance. They orchestrate a series of complex mechanism that result in mineralization of dentin. Odontobalst cells secrete a collagen-based matrix and release numerous membrane-bound matrix vesicle. The vesicles surrounding organic matrix initiate the mineral deposition in dentin. The expression and function of Dynamin II in odontoblast differentiation has not yet been reported. Therefore, we investigate the expression and possible role of the Dynamin II in odontoblast during developing tooth and mineralization.

The Dynamin II mRNA and protein expressed during differentiation in MDPC-23 cells. The expression level of mRNA and protein were significantly high at early stage of differentiation and then gradually decreased after that. Also, the result of immunohistochemisty showed that Dynamin II not localized embryonic day 17 (E17) and 21 (E21) under early bell stage.

However, Dynamin II was expressed strongly in the odontoblast layer at postnatal day 1 (PN1) and gradually decreased at postnatal day 3 (PN3) and 5 (PN5). Also, Dynamin II protein was expressed also in odontoblastic process as well as in adjacent the nuclear region at postnatal day 15 (PN15) on the functional stage. The length of odontoblast was increased gradually from PN1 to PN15 and decreased at postnatal day 21 (PN21).
In conclusion, Dynamin II may relate with transport the vesicle containing collageneous and non-collageneous protein for formation of dentin in odontoblast.

Key Words: Dynamin II, Tooth development, Odontoblast Differentiation, MDPC-23 cell

Ⅰ. 서 론

치아의 발생은 크게 싹시기, 모자시기, 종시기 세 단계로 나뉘고 이것이 순서대로 진행된다. 이중에서 상아질형성은 종시기 말기에 형성되기 시작하는데, 상아질은 치아의 대부분을 형성하는 부분으로 치수 바깥쪽에 위치한 상아모세포라는 아주 특별한 종류의 세포로부터 만들어지게 된다(Nanci, 2008). 상아모세포는 치유두 세포로부터 분화하고 내법랑상피와 인접한 지역에 유기기질을 분비한다. 이 유기기질은 0.1-0.2 μm 정도로 큰 직경을 가지는 교원질섬유가 포함되어있다. 상아모세포는 상아모세포돌기가 확장되면서 치아의 중심부를 향해 움직이기 시작한다. 또한 상아모세포는 기질에 교원질 및 비교원질단백질을 분비하여 석회화를 진행시킨다(Lisi et al., 2003). 상아질에는 석회화 침착 조절에 관여하는 Dentin sialophosphoprotein(DSPP), Dentin sialoprotein(DSP), Dentin phosphoprotein (DPP), Dentin matrix protein 1, 2, 3(DMP1, DMP2, DMP3)와 같은 단백질들이 포함되어 있다(Butler, 1998). 일단 상아모세포가 분화 후 기질 분비 과정에 착수하면 교원바탕기질(collagen-based matrix)과 매우 많은 막결합성 바탕질소포들(membrane-bound matrix vesicle)을 분비하고, 이 소포질들이 주변 기관으로 이동하면서 상아질의 석회화 침착을 진행시킨다(Arana-Chavez & Massa 2004). 이렇게 형성된 상아질 층은 외피상아질 이라고 부르고, 보통 두께는 약 5-30 μm 정도이다(Linde & Goldberg 1993). 또한 상아질은 형성된 시기에 따라 일차상아질, 이차상아질 그리고 삼차상아질로 분류된다(Linde, 1992).

Dynamin은 GTPaes 단백질이고 endocytic membrane fission, caveolae internalization 그리고 골지체에서 단백질 수송에 관계하는 것으로 알려져 있다(Obar et al., 1991). 또한 Dynamin은 주로 세포 바깥쪽으로부터 안쪽으로 물질을 수송하는 과정인 세포내이입(endocytosis)에 관여하는 것으로 알려졌다(Jeong et al., 2001; Sever, 2003). 지금까지 모두 세 종류의 Dynamin 단백질이 발견되었는데 그 중 Dynamin Ⅰ은 신경세포나 신경전달물질을 분비하는 세포에서 주로 발현하고(Obar et al., 1990), Dynamin Ⅱ는 대부분의 세포에서 발견되며(Cook et al., 1994; Sontag et al., 1994), Dynamin Ⅲ는 정소에서 주로 발현하는 것으로 밝혀졌다(Nakata et al., 1993). 최근에는 세포의 이동에 관여하는 신호전달분자를 조절한다는 결과도 발표되는 등 Dynamin Ⅱ의 세포 내 기능적 다양성이 보고되고 있

다(Jeong et al., 2005; Jeong et al., 2006).

상아모세포가 분화하는 동안 핵은 기저막 쪽으로 위치하고 세포소기관, 과립형 질내세망 그리고 미토콘드리아들이 많아지고 뚜렷해지면서 분비단백질형성이 왕성하게 일어난다(Couve, 1986). 따라서 이미 보고된 Dynamin II의 다양한 기능 중 상아모세포 내에서 합성된 상아질 형성관련 단백질 소포의 세포 내 이동과 세포 형태 변화에 관여할 것으로 생각되지만, 지금까지 치아의 발생과정 중 상아모세포에서 Dynamin II의 발현 및 기능연구가 보고된 바가 없었다. 따라서 본 연구에서는 생쥐의 치아 발생과정 조직 및 상아모세포주의 분화과정에서 Dynamin II의 발현 양상 및 기능에 대해 알아보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. MDPC-23 세포의 배양 및 분화유도

치유두세포(dental papilla cell) 유래의 MDPC-23 세포주를 2 × 10^5 수로 60 mm 배양 접시에 접종하고 5% CO_2 농도를 유지하는 배양기에서 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM; Gibco BRL, USA) 에 10 % Fetal Bovin Serum(FBS, Gibco BRL)과 1X antibiotic-antimycotic solution(Gibco BRL), 1X non-essential amino acid solution(Gibco BRL)을 첨가하여 사용하였다. 분화 유도를 위해서 FBS 농도를 5 %로 줄이고 β-glycerol phosphate(SIGMA, USA) 10 mM과 ascorbic acid(SIGMA) 50 μg/ml을 추가로 첨가하여 분화배양액으로 사용하였다. 분화 시료는 세포가 60 mm 배양 접시의 90 %를 차지한 상태에서 21일간 배양하여 0일, 4일, 7일, 14일, 21일 간격으로 준비하였다.

2. 역전사중합효소반응 (Reverse Transcription and Polymerase chain reaction)

분화된 MDPC-23 세포들은 Tri reagent(MRC Inc, USA)를 이용하여 각각 총 RNA를 추출하였다. cDNA 합성을 위해서 AccuPower RT Premix(Bioneer, KOR)을 사용하여 RT(reverse-transcription)반응을 하였고, Ex Taq polymerase(TaKaRa, KOR)를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. Dynamin II 특이적 프라이머인 F-5'-GCC GAG TCA CTG TCC TGG TA-3', R-5'-GGT CTG CCG AGG AGT ATA GGT-3'와 대조 발현군인 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 특이적 프라이머인 F-5'-CCA TGG AGA AGG CTG GG-3', R-5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'을 제작하여 PCR 반응을 하였으며, 반응조건은 Dynamin II가 30 cycles, 94℃ 5분, 94℃ 40초, 55℃ 40초, 72℃ 35초, 72℃ 5분, GAPDH는 30 cycles, 94℃ 5분, 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 30초, 72℃ 5분으로 각각 설정하였다. PCR 반응 후 생산물은 0.5X TBE buffer (Tris-Borate-EDTAbuffer)에 ethidium bromide(EtBr)이 첨가된 1.5 % 농도의 아가로스겔에 전기영동 한 후 Gel-Doc(BIORAD, USA)에서 확인하였다. PCR 반응 후 나타난 Dynamin II 밴드 크기는 475 bp이고 GAPDH는 199 bp로 확인되었다. 각 밴드의 밀도 측정 및 정량은

Science lab Image Gauge(FUJI FILM, JAP) 프로그램을 이용하였다.

3. 면역학적 단백질 검출법(Western blotting)

세포질 내에 있는 Dynamin II 단백질과 대조 발현군인 β-actin 단백질 발현을 분석하기 위하여 면역학적 단백질 검출 방법을 사용하였다. 먼저 분화시킨 MDPC-23 세포에서 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 50 mM Tris-Cl(pH 7.4), 2 mM Na_3VO_4, 2 mM $Na_4P_2O_7$, 50 mM NaF, 2 mM EDTA(pH 7.4) 그리고 단백질분해효소 억제제인 leupeptin과 aprotinin을 첨가한 NP-40 lysis buffer을 이용하여 세포질 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 30 μg씩 각각 같은 양을 정량 하여 실험에 사용하였고 SDS 10 %-polyacrylamide겔에 전기영동 하여 단백질을 분리해 냈다. 분리된 단백질을 nitrocellulose 막으로 이동 시킨 후, blocking solution(1X phosphate buffered saline, PBS + 5 % skim milk)에서 1시간 동안 실온 반응을 한 뒤에 세척 후, 새로운 blocking solution에 1차 항체인 anti-mouse Dynamin II(Upstate, USA)를 1:2,500 농도로 그리고 anti-mouse-β-actin(SIGMA)을 1:2,500 비율로 각각 넣고 4℃ 에서 16시간 동안 반응시켰다. 다음으로 세척 후 HRP(horseradish-peroxidase)가 연결된 goat-anti-mouse 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:10,000 비율로 처리하고 ECL(Amershamphamacia, UK)용액을 이용하여 발색 시킨 후 chemiluminescence film(Amershamphamacia)을 이용하여 현상하였다. 현상 필름에 나타난 Dynamin II 밴드의 크기는 110 kDa이고 β-actin은 42 kDa으로 각각 확인되었다. 현상 후 나타난 단백질 밴드의 밀도 측정 및 정량은 Science lab Image Gauge (FUJI FILM) 프로그램을 이용하였다.

4. 조직표본 제작

생쥐 치아발생 조직표본은 임신 10일 째인 암컷 ICR 생쥐(Damool Science, KOR)의 배아기 15일(Embryo 15 day, E15), 17일(E17)인 생쥐 태아와 생후 1일(Postnatal 1 day, PN1), 4일(PN4), 10일(PN10), 15일(PN15) 그리고 21일(PN21)에 이른 생쥐를 이용하여 제작하였다. 먼저 배아기 15일, 17일 그리고 21일에 이른 생쥐태아를 적출하기 위해 임신한 암컷 생쥐에 염산케타민(Ketamin 0.2 ml/100g, Yuhan, KOR)과 럼푼(Rompun 0.08 ml/100g, Bayerkorea, KOR)을 혼합한 용액을 근

육 주사하여 마취시켰다. 적출한 배아기 15일, 17일 생쥐태아와 출생 후 1일, 4일째인 생쥐는 악골을 절단한 후 즉시고정액(4 % paraformaldehyde, 1ml/L DEPC in 1X PBS, pH 7.4)에 옮겼다. 출생 후 10일, 15일 그리고 21일된 생쥐는 마취 후 개복하고 우심방으로 들어오는 대정맥을 절단한 후 좌심실에 DEPC-PBS(1ml/L DEPC in 1X PBS, pH 7.4)를 천천히 주입하여 순환시켰다. DEPC-PBS를 혈액이 완전히 제거 될 때까지 순환시킨 후 동일고정액을 주입하여 관류고정 하였다. 고정액을 완전히 순환시킨 후 하악과두를 포함한 악골을 적출하여 다시 새로운 동일 고정액 속에 4℃, 16시간 동안 고정하였다. 다음날 1X PBS용액으로 2시간 세척하고, 탈회액(10% EDTA, 1 % paraformaldehyde in 1X PBS, pH 7.4)에서 4주간 탈회 하였다. 탈회 후 70 %, 80 %, 90 %, 100 % I, 100 % II, 100 % III, 100 % IV 에탄올 처리를 하여 탈수하였고, 자일렌으로 투명화 과정을 거쳤으며, 파라핀을 침투시켜 포매 하였다. 파라핀 포매된 조직을 Motorized Rotary MicrotomeMT990(RMC products, USA)을 이용하여 5 μm두께의 절편으로 만든 후 3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate(SIGMA)로 코팅된 유리 슬라이드에 올리고 37℃ 신전기 위에서 하루 동안 건조 하였다.

5. 면역조직화학적 염색(Immunohistochemistry)

준비된 조직표본을 자일렌 I, 자일렌 II, 자일렌 III에 순서대로 5분씩 처리하여 탈 파라핀을 하고 100 %, 90 %, 80 %, 70 % 에탄올에 각각 5분씩 단계적으로 함수처리 하였다. 1X PBS로 조직표본을 5분씩 세 번 세척 후 100배 희석한 Tris-HCl(pH 7.5)용액에 1:1,000의 비율로 Proteinase K(Invitrogen, USA)를 첨가한 다음 37℃에서 20분간 조직 표본 위에 처리 하였다. 그 후 PBS로 조직표본을 5분씩 세 번 세척한 후 1차 blocking으로 과산화수소수가 포함된 완충액(0.6 % H_2O_2 in Methanol)을 20분간 상온에서 조직 표본 위에 처리 하였다. 다시 PBS로 조직표본을 5분씩 세 번 세척 하고 normal goat serum(Vector Lab, USA) 15 μl를 1X PBS 1 ml에 희석한 용액을 20분간상온에서 처리하는 2차 blocking을 수행 하였다. Normal goat serum희석액을 간단히 제거하고 새로운 normal goat serum희석 용액에 Dynamin II 항체(Upstate)를 1:100의 비율로 희석하여 4℃에서 16시간 동안 처리 하였다. 다음 날, 1X PBS로 10분간 두 번 세척 후 2차 항체인 goat-anti-mouse IgG(Vector Lab)를 1:200 비율로 동일 용액에 희석하여 조직 표

본 위에 상온에서 20분간 처리하였다. 다음으로 1X PBS로 10분간 2회 세척 후, 사용하기 30분전 1X PBS 용액에 희석한 ABC 시약(Vector Lab)을 조직 표본 위에 20분간 반응시켰다. 다시 1X PBS로 10분간 2회 세척 과정을 거치고 0.05 % DAB(Deaminobenzidine Tetrahydrochloride Vector Lab, USA)를 이용하여 1분 40초 동안 발색시켰다. 발색시킨 조직 표본을 2차증류수에 10분간 세척 후 Hematoxylin(Samchun Chemical, KOR)으로 15초간 대조염색 하였고 다시 2차증류수에 세척한 후 조직 표면에 탈수, 투명 및 봉입 과정을 수행 하였다. 염색된 조직 표본은 광학현미경(Carl Zeiss, GER)을 통해 관찰 하였다. 상아모세포 층에서 Dynamin II 단백질의 발현 강도는 면역 반응이 나타난 부위의 픽셀값과 음성대조군 픽셀값 사이의 차를 평균값으로 환산하여 측정하였다. 그리고 생쥐 치아 발생 중 상아모세포 길이는 출생 후 1일부터 출생 후 21일까지의 조직 표본을 이용하여 측정하였다. 픽셀값 및 상아모세포 길이 측정은 Axiovision LE release 4.6(Carl Zeiss) 프로그램을 이용하였다.

6. 통계분석

RT-PCR, 면역학적단백직검출, 면역조직화학적염색과 상아모세포 길이 측정 시 나타난 각 밴드 밀도, 픽셀값 그리고 길이의 통계적 분석을 위해 Excel 2007 프로그램(Microsoft, USA)을 이용하여 표준편차 측정 및 Student *t*-test 분석을 수행하였다. Student *t*-test 분석에서 $p<0.05$ 는 통계학적으로 유의적 차이가 있음을 의미한다.

III. 실험 결과

1. MDPC-23 세포 분화 과정에서 Dynamin II mRNA 및 단백질 발현

MDPC-23세포 배양액을 분화배지로 교체하고 4일, 7일, 및 21일 동안 각각 분화를 진행 시킨 후 RT-PCR을 통해 Dynamin II mRNA의 발현 정도를 알아보았다. Dynamin II mRNA는 분화를 유도하지 않은 MDPC-23세포에서 발현하였고 분화 유도 기간 동안 점진적으로 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 1a). 전기영동 후 밴드의 밀도를 측정한 결과 Dynamin II mRNA 발현은 분화 유도 4일째는 대조군 대비 16 %, 7일째에는 43 %, 14일째에는 64 % 그리고 21일째에는 82 % 감소한 것으로 나타났다(Fig. 1b). 면역학적단백질검출법을 이용해 Dynamin II 단백질 발현을 알아본 결과 mRNA 발현과 비슷한 양상을 나타냈고(Fig. 2a) 분화 유도 4일째에 대조군 대비 7 %, 7일째에는 41 %, 14일째에는 51 % 그리고 21일째에는 91 % 감소한 것으로 나타났다(Fig. 2b). 특히 mRNA와 단백질 분석에서 분화유도 14일째에서는 대조군의 발현에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1b, 2b).

2. 생쥐 치아발생 과정 중 상아모세포에서 Dynamin II 단백질 발현

1) 종시기 초기(Early bell stage)

배아기 17일째(E17)에는 법랑기관이 배아기 15일째(E15)(data not shown)보다 더 커졌고 치유두 내 외배엽성중간엽세포들이 내치아상피쪽으로 밀집되어 있었다(Fig 3a). 배아기 21일째(E21)에는 형태분화와 조직분화 단계인 초기 종시기가 관찰되었고, 내치아상피 가까운 곳에서 전상아모세포 층을 확인할 수 있었다. 하지만 이 두 시기 상아모세포 층에서는 Dynamin II 단백질 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 3a, b).

2) 종시기 후기(Advanced bell stage)

종시기 후기인 출생 후 1일째(PN1) 치아 발생조직에서는 상아질이 관찰 되었고

상아질 층 두께는 출생 후 1일째에서 5일째(PN5)에 걸쳐 점점 두꺼워진 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4a-c). 출생 후 1일째 Dynamin II 단백질은 상아모세포 층 전체에서 강하게 발현되었다가 출생 후 3일째와 5일째까지 감소하는 경향을 보였고(Fig. 4a-c), Dynamin II 발현 위치는 상아모세포층의 일부 세포에 국한되어 나타났다. 출생 후 3일째 조직에 대한 음성대조군 면역반응에서는 Dynamin II 단백질이 발현되지 않았다(Fig. 4d).

3) 치관기(Crown stage) 및 기능시기(Functional stage)

출생 후 10일(PN10)과 15일(PN15)에 상아질 층의 두께는 종시기 후기보다 더욱 두꺼워 졌다. 출생 후 10일째 상아모세포 층에서 Dynamin II 단백질은 출생 후 5일째와 비교하여 세포층 전반에 걸쳐 발현하였으나 세포 내 핵 위쪽 부위에 걸쳐 국소 발현되었다(Fig. 5a). 출생 후 15일 조직에서는 풋상아질과 접한 상아모세포 첨단 부위와 상아모세포 돌기에서도 Dynamin II 단백질이 발현되었다(Fig 5b). 출생 후 21일에 맹출된 치아의 상아모세포 층에서 Dynamin II 단백질은 국한된 세포에서 발현되었다(Fig 5c).

4) 종시기와 기능시기의 상아모세포 길이 변화와 면역조직화학염색법에 의한 상아모세포 층에서 발현된 Dynamin II 발현강도 측정

종시기 후기인 출생 후 1일부터 5일까지 상아모세포 길이는 평균 17.2 μm를 나타냈고 출생 후 3일과 5일째에는 평균 27.4 μm와 33.4 μm로 각각 측정되었다. 치관기인 출생 후 10일과 15일 상아모세포 길이는 각각 32.4 μm와 34.5 μm였고 기능시기인 출생 후 21일째에는 20.3 μm였다. 측정된 상아모세포 길이는 출생 후 1일째에 비해 5일째에 유의성 있게 증가하였다(Fig. 6a). 치아 발생 동안 상아모세포 층에서 Dynamin II 단백질 발현 강도는 출생 후 1일째 대비 3일째 12 %, 5일째 36 %, 10일째 41 %, 15일째 50 % 그리고 21일째 69 % 각각 감소하였다. 측정된 Dynamin II 단백질 발현 강도는 출생 후 1일째에 비해 5일째에 유의성 있게 감소하였으며 이 경향은 치관기까지 유지되었다(Fig. 6b). 이와 같은 결과를 분석하여 상아모세포 길이 측정과 Dynamin II 발현정도를 모식도로 간소화 하였다(Fig. 7).

IV. 총괄 및 고안

서로 인접한 내법랑상피세포와 치유두세포는 상호간에 성장인자 및 여러 신호전달 물질들이 관여하여 법랑모세포와 상아모세포로 각각 분화하게 된다(Ruch et al., 1995). 치유두 세포는 먼저 모자시기에 전상아모세포(preodontoblast)로 분화하고(Ruch, 1984; Ruch, 1985) 이동끝(leading-edge) 세포질돌기를 이용해 내법랑상피의 기저막 아래쪽 세사에 결합하면서 성숙한 상아모세포로 분화하게 된다(Osman & Ruch, 1981). 초기 종시기에는 상아모세포 분화가 가장 왕성하고 후기 종시기에 상아모세포는 상아기질을 합성하기 시작한다(Butler, 1995). Dynamin II는 뼈파괴세포의 주름가장자리(ruffled border)에서 분해된 뼈 기질의 세포내이입(Mulari et al., 2003)과 뇌하수체피질자극세포 내의 골지체에서 호르몬 분비소포의 형성을 조절하는 것으로 보고되었다(Yang et al., 2001). 또한 Dynamin II는 세포 내에서 소포들의 움직임에 관여하며, 세포골격의 재구성에도 연관이 있는 것으로 알려졌다(Henley et al, 1999). 본 실험에서 MDPC-23세포에서는 분화를 유도하지 않은 상태에서 Dynamin II 단백질이 강하게 발현하였는데, 이는 이미 보고된 Dynamin II의 기능으로 미루어 보아 상아모양세포(odontoblast like cell)의 형태변화 및 영양분들의 세포내이입, 세포내 소포형성과 수송 그리고 세포골격 재구성에 모두 관련이 있기 때문인 것으로 생각된다.

상아모세포주인 MDPC-23 세포와 MO6-G3에서 분화 유도 시 DPP, DSP 그리고 등과 같은 비교원성 단백질이 발현하고 광화를 촉진하는 것으로 알려졌다(Hanks et al., 1998; George et al 1995). 상아모세포는 상아질 합성에 필요한 단백질들을 운반 후 분비하기 위해 골지복합체로부터 분비과립들을 만들어내는데 이러한 과립들은 키네신(kinesin)과 같은 운동단백질 및 ATP를 에너지원으로 사용하여 상아모세포 돌기로 이동한 후 밖으로 분비된다(Garant, 2003). 또한 분비소포들이 상아모세포돌기 표면에도 다수 위치한 것으로 밝혀졌다(Nishikawa & Kitamura, 1987). MDPC-23 세포에 분화를 유도한 결과 초반에는 Dynamin II 발현이 강하다가 시간이 지날수록 줄어드는 경향을 보였다. 이것은 상아모세포의 분비기에 광화와 관련된 단백질의 합성이 많아지면서 이들을 소포의 형태로 세포외로 분비하는데 Dynamin II가 관여할 것이기 때문에 발현이 높은 것으로 생각되고 광화가 진행되면서 합성되는 단백질의 양이 감소됨에 따라 소포의 이동이 줄어들면서 Dynamin II의 발현

도 줄어드는 것으로 생각된다.

면역세포화학 방법을 통한 전자현미경 관찰 결과 상아모세포 내에서 전교원질 단백질이 위치한 과립과 비교원질성인 BSP와 Osteocalsin 단백질이 세포 내 또 다른 과립에 위치한다(Nanci, 2008). 또한 상아모세포에서 DPP 단백질이 과립형질내세망의 cisternae와 골지체 그리고 주변에 위치한 소포들에서도 발견되었으며, 합성된 DPP 단백질은 소포에 둘러싸인 상태로 상아모세포 돌기 부위로 운반 후 분비된다(Gorter de Vries & Wisse, 1989). 또한 사람의 치아 발생과정 동안 상아모세포 영역에서 Osteocalsin, Osteonectin 그리고 DSPP가 발현하는 것으로 알려졌다(Papagerakis et al., 2002). Dynamin II의 경우 Syndapin II라는 단백질과 복합체를 이루어 trans-Golgi network에서 소포 형성을 촉진하는 것으로 보고되었다(Kessels et al., 2006).

상아모세포는 활동 상태에 따라 분비기와 중간 단계인 이행기 그리고 휴지기로 나뉘고 세포형태 및 소기관의 분포가 각각 다른데, 분비기 상아모세포는 전상아모세포보다 길이가 길어지고 직경이 커지면서 세포 소기관들이 매우 뚜렷해지고 소포들과 과립형질내세망, 골지복합체, 분비과립 및 미토콘드리아들이 잘 발달되어 있어 단백질 합성이 활발히 일어난다고 알려져 있다(Couve, 1986). 이행기 상아모세포는 폭이 더 좁아지고 과립형질내세망의 양이 감소하며 자가포식공포들이 나타나는데 이것은 세포질 재정비와 관련이 있다. 휴지기 상아질모세포는 작고 밀집된 상태이며 세포질에서 적은 수의 큰 공포가 관찰되는 것을 제외하고는 다른 세포 소기관이 관찰되지 않고 분비과립은 거의 존재하지 않는다(Couve, 1986). 출생 후 1일에서 5일 사이에 관찰된 후기 종시기는 상아질이 만들어지기 시작하는 것으로 알려져 있다(Lisi et al., 2003). 이 시기의 상아모세포는 길이가 신장되고 상아질층이 점점 두꺼워 지는데 이것은 세포가 극성을 지님으로서 세포 골격 및 소기관의 분포변화에 의해 상아질 합성이 활발하게 일어남을 나타낸다(Garant & Cho, 1985; Mesgouez et al., 2006). 발생 중인 소구치 치근의 첨단 부위에는 전상아모세포가 위치하며, 교두부위에서는 분비기 상아모세포가 치경쪽 치관부에서는 휴지기 상태의 상아모세포가 관찰되었는데(Couve, 1985), 본 실험결과 출생 후 1일째 상아모세포는 길게 신장되어 일렬로 나열된 형태를 보이며 Dynamin II가 세포질 전체에 걸쳐 발현하였고, 출생 후 3일과 5일의 상아모세포 층에서는 일부 세포에 국한되어 발현하였다. 흰쥐 대구치 발생과정 중 치관기인 출생 후 10일, 14일, 16일, 그리고 완전한 치아 맹출이 일어난 출생 후 40일 까지 상아모세포 세포질 영

역 넓이, 형질내세망 길이 및 골지체 길이를 측정한 결과 시간이 지날수록 줄어들었고, 길이 대 직경비도 감소하는 것으로 나타났다(Romagnoli et al., 1990). 본 연구에서도 치관기에 이른 출생 후 10일과 15일의 상아모세포 길이는 출생 후 5일과 별 차이가 없었지만 기능 시기인 출생 후 21일째에는 출생 후 1일째와 비슷한 크기로 줄어들었고 상아질 두께는 더 증가한 것을 알 수 있었다. 또한 출생 후 10일째 상아모세포에서 Dynamin II는 핵 위쪽 부위 세포질에 국한되어 발현되었다. 출생 후 15일 조직에서는 핵 위쪽 부위 세포질뿐만 아니라 상아모세포 돌기에서도 발현되었고 기능시기인 출생 후 21일째 에서는 세포질 끝 부위에서만 약하게 발현하였다. 따라서 Dynamin II는 상아모세포 활동 상태에 따른 광화 관련 단백질들의 분비과정에 관여할 것으로 사료된다.

결론적으로 상아모세포에서 Dynamin II의 기능은 상아질 형성관련 단백질을 포함한 분비소포의 운반에 관여할 것으로 생각되지만, 상아모세포내 교원질성 비교원질성 단백질을 포함한 소포와 이미 알려진 이동단백질 등과 관련된 Dynamin II의 기능 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

V. 결 론

Dynamin II는 GTPase 단백질로서 세포내 이입과 caveolae internalization 그리고 골지체에서 단백질 수송에 관계하는 것으로 알려져 있다. 치아 발생 과정 중 상아모세포는 외배엽성 간엽세포에서 기원한 세포로서 교원바탕질과 여러 비교원성 바탕질들을 합성하고 막결합성소포를 통해 분비함으로써 상아질을 형성한다. Dynamin II의 기능 및 상아모세포의 특성으로 보아 Dynamin II가 상아모세포의 상아질 형성에 관여할 것으로 보이지만 치아발생 과정 중 상아모세포에서 Dynamin II의 발현과 기능에 대해 보고된 연구는 없었다. 따라서 본 연구는 치아 발생 시 상아모세포의 분화 및 상아질 형성 과정에서 Dynamin II의 발현 및 기능에 대해 알아보고자 하였다.

분화를 유도한 상아모세포주인 MDPC-23세포에서 Dynamin II mRNA와 단백질의 발현을 확인 하였고 초반에 발현이 강하였으며 발현 양상은 감소하였다. 생쥐 치아 발생 표본에서 상아모세포에서 발현되는 Dynamin II에 대한 면역조직화학적염색 결과 배아기 17일과 21일에서는 발현하지 않았지만 출생 후 1일부터 강하게 발현하기 시작했고 출생 후 3일과 5일까지 발현이 감소하였다. 또한 출생 후 10일에는 핵 위쪽 부위에 걸쳐 Dynamin II가 발현하였고 출생 후 15일째에는 상아모세포 돌기에서 발현하였다. 출생 후 1일부터 15일까지 상아모세포의 길이는 신장하였지만 21일째는 줄어들었다. 따라서 이상의 결과들을 종합해보면 Dynamin II는 세포 내에서 상아질 형성과 관련된 단백질을 포함한 분비소포들의 세포내 운반에 관여할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Arana-Chavez VE & Massa LF (2004) Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. Int J Biochem Cell Biol 36(8):1367-1373.

Butler WT (1995) Dentin matrix proteins and dentinogenesis. Connect Tissue Res 33:56-65.

Butler WT (1998) Dentin matrix proteins. Eur J Oral Sci 106 Suppl 1:204-210.

Cook T, Urrutia R, McNiven MA (1994) Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. Proc Natl Acad Sci USA 91: 644-648.

Couve E (1985) Morphometric analysis of the nucleolus during the life cycle of human odontoblasts. Anat Rec 213(2):215-224.

Couve E (1986) Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. Arch Oral Biol 31(10):643-651.

Garant PA & Cho MI (1985) Ultrastructure of the odontoblast. In: The chemistry and biology of mineralized tissues. Butler WT, editor. Birmingham, AL: Ebsco Media, Inc., pp. 22-32.

Garant PR (2003) Oral cells and tissues. Quintessence Publishing group 4 pp.

George A, Silberstein R, Veis A (1995) In situ hybridization shows Dmp1 (Ag1) to be a developmentally regulated dentin-specific protein produced by mature odontoblasts. Connect Tissue Res 33:67-72.

Gorter de Vries I & Wisse E (1989) Ultrastructural localization of dentine

phosphoprotein in rat tooth germs by immunogold staining. Histochemistry 91(1):69-75.

Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT (1998) Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. Eur J Oral Sci 106 Suppl 1:260-266.

Henley JR, Cao H, McNicven MA (1999) Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. The FASEB Journal, 13, S243-S247.

Jeong MJ, Yoo J, Lee SS, Lee KI, Cho A, Kwon BM, Moon MJ, Park YM, Han MY (2001) Increased GTP-binding to Dynamin II does not stimulate receptor-mediated endocytosis. Biochem Biophys Res Commun 283(1):136-142.

Jeong MJ, Yoo J, Cho HJ, Oh ES, Han MY (2005) Dynamin II interacts with syndecan-4, a regulator of focal adhesion and stress-fiber formation. Biochem Biophys Res Commun 328(2):424-431.

Jeong SJ, Kim SG, Yoo J, Han MY, Park JC, Kim HJ, Kang SS, Choi BD, Jeong MJ (2006) Increased association of Dynamin II with Myosin II in ras transformed NIH3T3 cells. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 38(8):556-562.

Kessels MM, Dong J, Leibig W, Westermann P, Qualmann B (2006) Complexes of syndapin II with dynamin II promote vesicle formation at the trans-Golgi network. J Cell Sci 119(Pt 8):1504-1516.

Linde A (1992) Structure and calcification of dentin. In Bonucci E, editor: Calcification in biological systems, Boca Raton, Fla, CRC press.

Linde A & Goldberg M (1993) Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 4:679-728.

Lisi S, Peterková R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H (2003) Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. Connect Tissue Res. 44 Suppl 1:167-170.

Mesgouez C, Oboeuf M, Mauro N, Colon P, MacDougall M, Machtou P, Sautier JM, Berdal A (2006) Ultrastructural and immunocytochemical characterization of immortalized odontoblast MO6-G3. Int Endod J 39(6):453-463.

Mulari MT, Zhao H, Lakkakorpi PT, Väänänen HK (2003) Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. Traffic 4(2):113-125.

Nakata T, Takemura R, Hirokawa N (1993) A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. J Cell Sci 105(Pt 1): 1-5

Nanci A (2008) Ten Cate's Oral histology. Development, Structure, and Function (7th edition) Elsevier Inc pp.220-221.

Nishikawa S & Kitamura H (1987) Microtubules, intermediate filaments, and actin filaments in the odontoblast of rat incisor. Anat Rec 219(2):144-151.

Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, Vallee RB (1990) Molecular cloning of the microtuble-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. Nature 347:256-261.

Obar RA, Shpetner HS, Vallee RB (1991) Dynamin: a microtubule-associated GTP-binding protein. J Cell Sci Suppl 14:143-145.

Osman M & Ruch JV (1981) Behavior of odontoblasts and basal lamina of trypsin or EDTA-isolated mouse dental papillae in short-term culture. J Dent

Res 60:1015-1027.

Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M (2002) Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. Bone 30(2):377-385.

Romagnoli P, Mancini G, Galeotti F, Francini E, Pierleoni P (1990) The crown odontoblasts of rat molars from primary dentinogenesis to complete eruption. J Dent Res 69(12):1857-1862.

Ruch JV (1984) Tooth morphogenesis and differentiation. In: Linde A (ed). Dentin and dentinogenesis. Boca Raton, FL: CRC Press 47-49.

Ruch JV (1985) Odontoblast differentiation and formation of the odontoblast layer. J Dent Res 64S:489-498.

Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C (1995) Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol 39(1):51-68.

Sever S (2003) Dynamin and endocytosis. Curr Opin Cell Biol 14 (4):463-467.

Sontag JM, Fykse EM, Ushkaryov Y, Liu JP, Robinson PJ, Südhof TC (1994) Differential expression and regulation of multiple dynamins. J Biol Chem 269(6):4547-4554.

Yang Z, Li H, Chai Z, Fullerton MJ, Cao Y, Toh BH, Funder JW, Liu JP (2001) Dynamin II regulates hormone secretion in neuroendocrine cells. J Biol Chem 276(6):4251-4260.

사진부도 설명

Figure 1. Dynamin II mRNA expression in MDPC-23 cells during differentiation. (A) Dynamin II mRNA expression in MDPC-23 cells incubated with differentiation medium for day 4, 7, 14 and day 21, respectively. **(B)** The Dynamin II mRNA expression level was analyzed using densitometry. The Dynamin II mRNA level was normalized to the GAPDH mRNA expression level. Dynamin II mRNA expression was decreased in MDPC-23 cells during mineralization. Statistically significant difference (n= 3, *p < 0.05). The data are expressed as mean ± standard deviation. (M= 100 bp DNA size marker).

Figure 2. Dynamin II protein expression in MDPC-23 cells during differentiation. (A) Western blotting results of the Dynamin II protein in the differentiated MDPC-23 cell lysates. **(B)** The Dynamin II protein expression level was analyzed using densitometry. Dynamin II protein was expressed strongly in control group. The expression pattern of Dynamin II proteine was decreased in MDPC-23 cells during mineralization. β-actin was used as the internal control for Western blotting. Each experiment was repeated three times. Statistically significant difference (n= 3, *p < 0.05). The data are expressed as mean ± standard deviation.

Figure 3. Immunohistochemistry for Dynamin II at early bell stage. (a) At embryonic day 17 (E17) and **(b)** embryonic day 21 (E21), the Dynamin II protein was not expressed on dental papilla and inner enamel epithelium (dp: dental papilla, iee: inner enamel epithelium). Inserted figures represents a low magnified images. Scales: (a) and (b) 20 μm; Scales bars of inserted figures are 100 μm respectively.

Figure 4. Immunohistochemistry for Dynamin II at advanced bell stage. (a) The expression of Dynamin II protein expressed strongly at postnatal day 1 (PN1) in cytoplasm of odontoblast. **(b)** Dynamin II protein was observed similarly in cytoplasm of odontoblast at postnatal day 3 (PN3) **(c)** Expression of Dynamin II protein was decreased in odontoblast at postnatal day 5 (PN5) compared with PN1. **(d)** Negative control of PN3 was not showed the immunohistochemical signals of Dynamin II (d: dentin, od: odontoblast, pd: predentin). Inserted figures represents a low magnified images. Scales: (a), (b), (c) and (d) 20 μm; Scales bars of inserted figures are 100 μm respectively.

Figure 5. Immunohistochemistry for Dynamin II at crown and functional stage. (a) The Dynamin II localized in adjacent the nuclear region at postnatal day 10 (PN10) **(b)** Dynamin II protein was expressed also in odontoblastic process (arrow) as well as in adjacent the nuclear region at postnatal day 15 (PN15). **(c)** Expression of Dynamin II decreased in a part of odontoblast layer at postnatal day 21 (PN 21). Inserted figures represents a low magnified images. Scales: (a), (b) and (c) 20 μm; Scales bars of inserted figures are 100 μm respectively.

Figure 6. Measurement of length and Dynamin II protein intensity in odontoblasts during tooth development. (A) Quantitative analysis of the length of odontoblast from postnatal day1 to 21. The length of odontoblast was increased at postnatal day 1 to postnatal day 15 and decreased at postnatal day 21. **(B)** Immunostainingintensity of Dynamin II protein in odontoblast area during tooth development. The intensity of Dynamin II protein expression was decreased in odontoblasts during tooth development. The average of length and pixel intensity standard deviation was plotted. (PN: postnatal).

Figure 7. The diagram for altering length of odontoblast and expression intensity and localization of Dynamin II in odontoblast during tooth development. The expression of Dynamin II protein expressed strongly at advanced bell stage in cytoplasm of odontoblast. Dynamin II protein localized in adjacent the nuclear region at PN10. Dynamin II protein was expressed also in odontoblastic process as well as in adjacent the nuclear region at PN15. At functional stage, Dynamin II was expressed weakly in apical area in odontoblast.

사 진 부 도

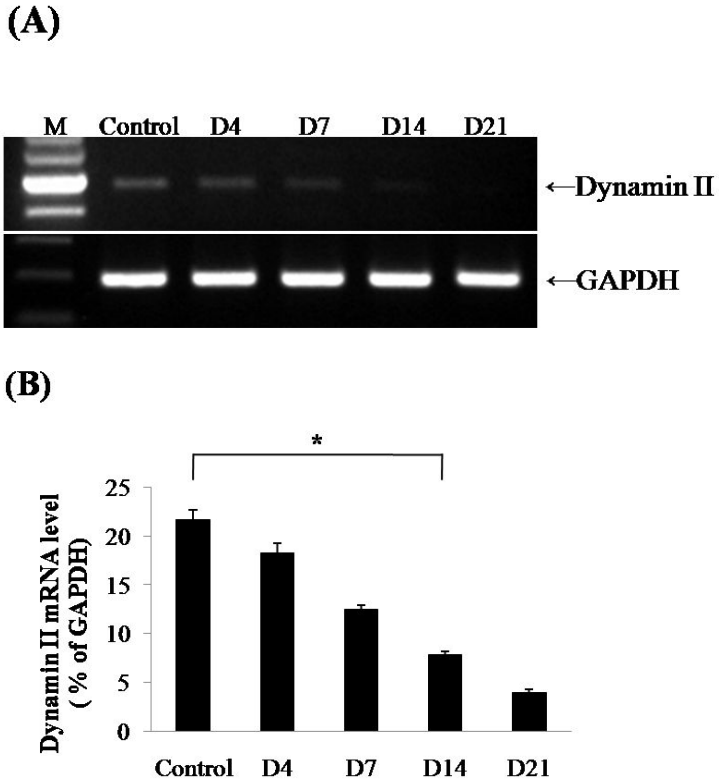

Figure 1. Dynamin II mRNA expression in MDPC-23 cells during differentiation.

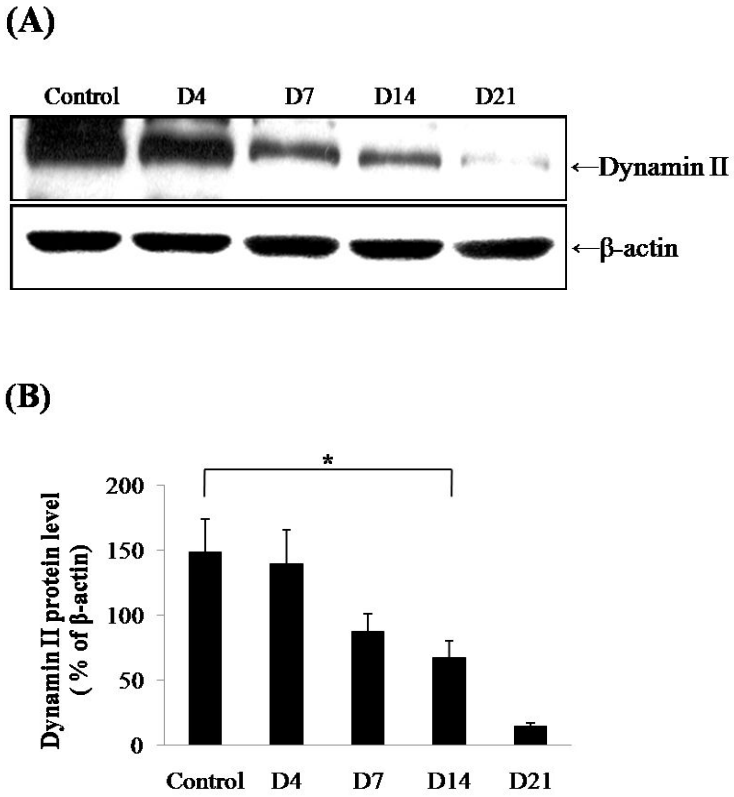

Figure 2. Dynamin II protein expression in MDPC-23 cells during differentiation.

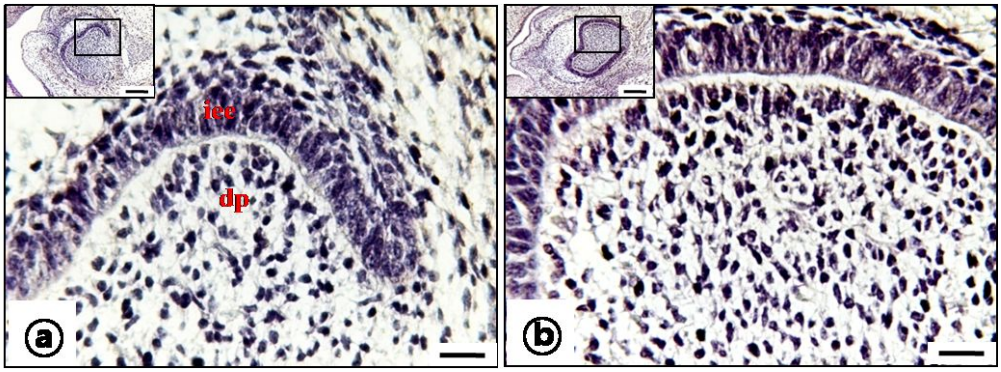

Figure 3. Immunohistochemistry for Dynamin II at early bell stage.

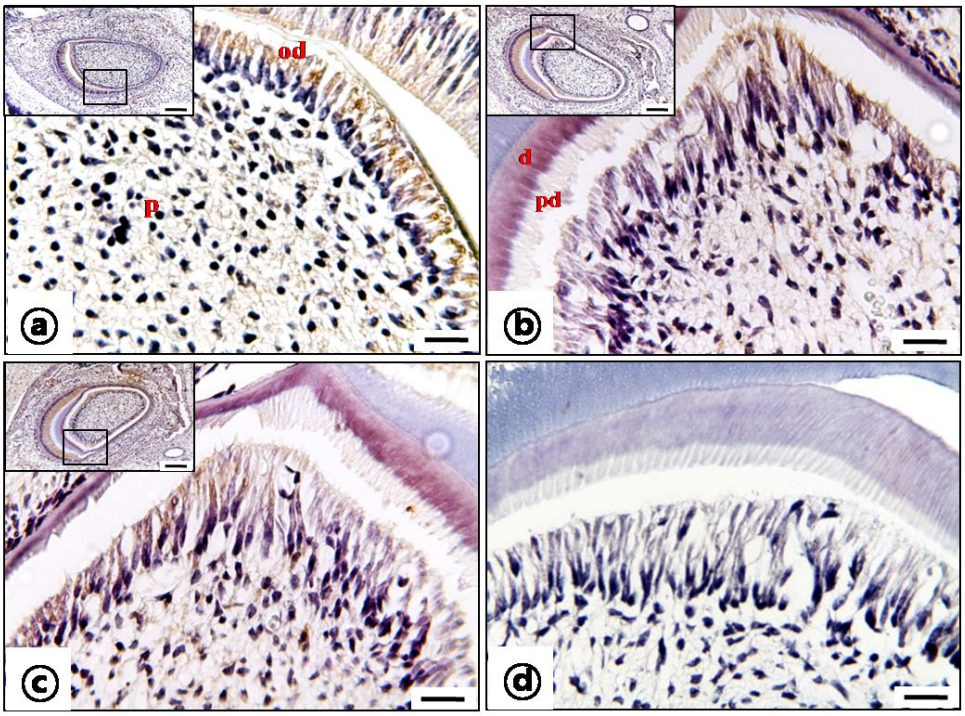

Figure 4. Immunohistochemistry for Dynamin II at advanced bell stage.

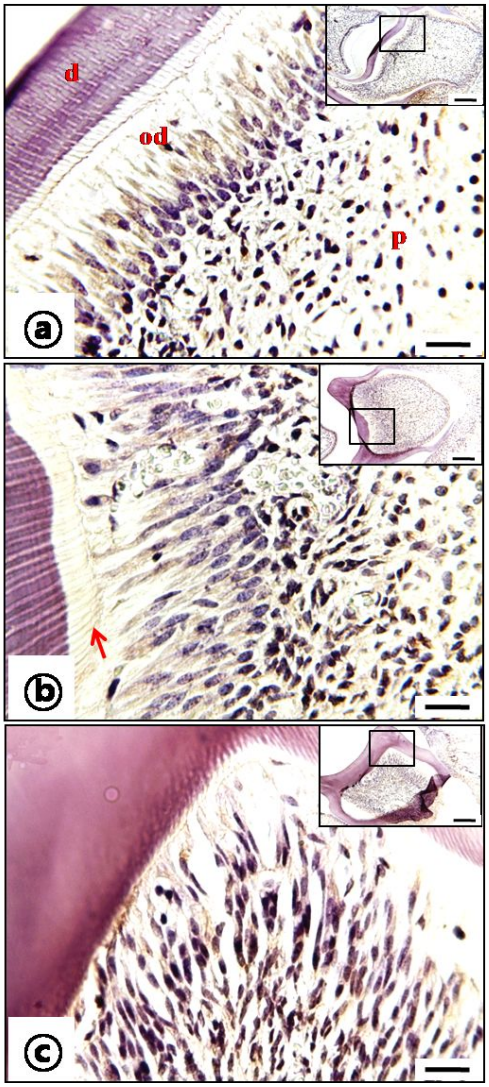

Figure 5. Immunohistochemistry for Dynamin II at crown and functional stage.

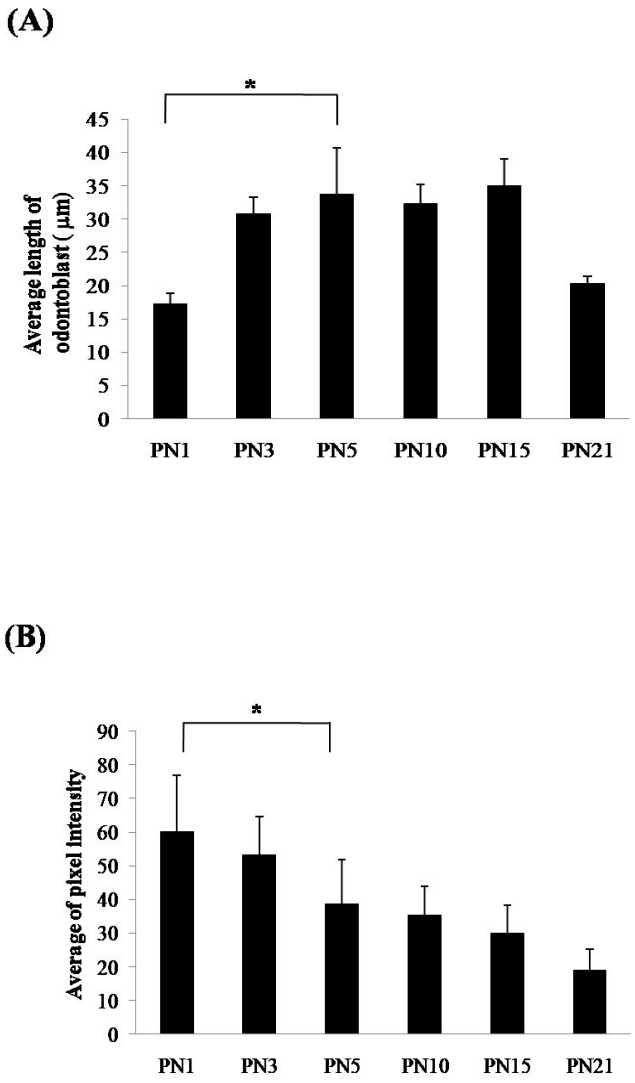

Figure 6. Measurement of length and Dynamin II protein intensity in odontoblasts during tooth development.

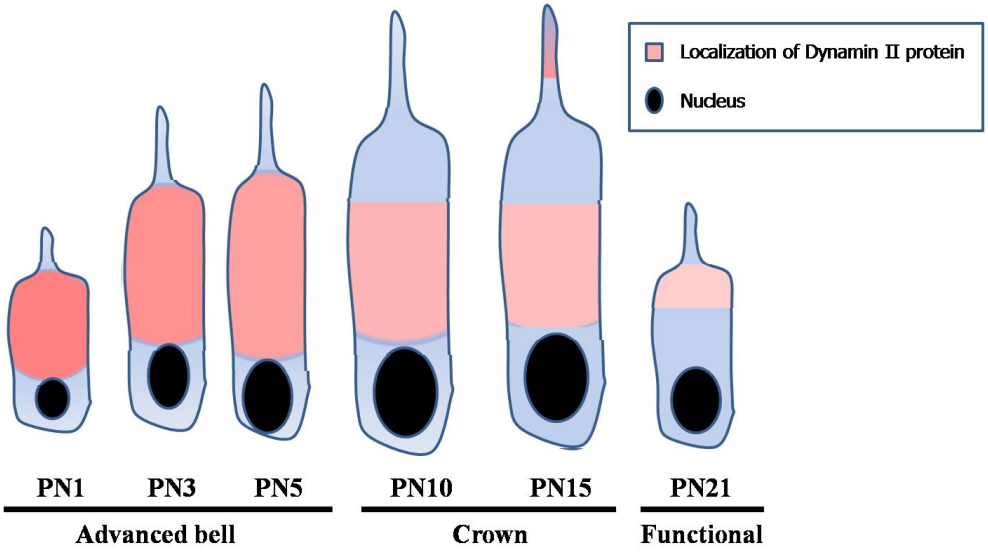

Figure 7. The diagram for altering length and expression intensity and localization of Dynamin II in odontoblast during tooth development.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20087439	과 정	박사
성 명	한글: 오 종 화 한문: 吳 鍾 和 영문: Oh Jong Hwa				
주 소	전남 광양시 광영동 788-1				
연락처	E-mail : dener24@kornet.net				
논문제목	한글: 생쥐 치아발생과정 중 상아모세포에서 Dynamin II의 발현				
	영문: Expression of the Dynamin II in odontoblast during mouse tooth development				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2010년 2월

저작자: 오 종 화 (인)

조선대학교 총장 귀하