

2007년 2월  
박사학위논문

배양 상아질모세포 분화과정에서  
아미노산 수송계  $L$ 의 발현

조선대학교 대학원

치의학과

안 성 민

배양 상아질모세포 분화과정에서  
아미노산 수송계 *L*의 발현

*Expression of amino acid transport system L  
during odontoblast differentiation*

2007년 2월 일

조선대학교 대학원

치의학과

안 성 민

배양 상아질모세포 분화과정에서  
아미노산 수송계  $L$ 의 발현

지도교수 김 홍 중

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2006년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

안 성 민

# 안성민의 박사학위 논문을 인준함

위원장    서울대학교    교    수    김    중    수    인

위    원    서울대학교    교    수    박    경    표    인

위    원    조선대학교    교    수    박    주    철    인

위    원    조선대학교    교    수    김    도    경    인

위    원    조선대학교    교    수    김    흥    중    인

2006년 12월 일

조선대학교 대학원

# 목 차

표목차.....	iii
도목차.....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>I. 서론</b> .....	1
<b>II. 실험재료 및 방법</b> .....	4
1. 실험재료.....	4
2. 상아질모세포의 배양과 분화.....	4
3. 역전사 중합효소연쇄반응 분석.....	4
4. Alizaline red-S 염색.....	6
5. Uptake 실험.....	6
6. 통계학적 검정.....	7
<b>III. 실험결과</b> .....	8
1. 배양 상아질모세포 분화과정에서 아미노산 수송체 L의 발현.....	8
2. 배양 상아질모세포 분화과정에서 분화 특이유전자의 발현.....	8

3. 배양 상아질모세포 분화과정에서 세포형태의 변화.....	9
4. 배양 상아질모세포 분화과정에서 석회화 결절의 형성.....	9
5. 배양 상아질모세포 분화과정에서 [ <sup>14</sup> C]L-Leucine의 수송특성.....	10
<b>IV. 총괄 및 고안.....</b>	<b>11</b>
<b>V. 결론.....</b>	<b>15</b>
<b>VI. 참고문헌.....</b>	<b>16</b>
<b>VII. 사진부도 설명.....</b>	<b>21</b>
<b>VIII. 사진부도.....</b>	<b>24</b>

## 표 목 차

Table 1. Primer sequences for PCR.....	5
--	---

## 도 목 차

Fig. 1. Detection of LAT1 mRNA by RT-PCR.....	24
Fig. 2. Detection of LAT2 mRNA by RT-PCR.....	25
Fig. 3. Detection of 4F2hc mRNA by RT-PCR.....	26
Fig. 4. Detection of osteonectin (ON) mRNA by RT-PCR.....	27
Fig. 5. Detection of alkaline phosphatase (ALP) mRNA by RT-PCR.....	28
Fig. 6. Change of cell morphology in MDPC-23 cells.....	29
Fig. 7. Mineralized nodule formation in MDPC-23 cells.....	30
Fig. 8. [ <sup>14</sup> C]L-Leucine uptake by MDPC-23 cells.....	31



# *ABSTRACT*

## *Expression of amino acid transport system L during odontoblast differentiation*

*Ahn, Seong-Min*

*Advisor: Prof. Kim, Heung-Joong, D.D.S., M.S.D., Ph.D.*

*Department of Dentistry,*

*Graduate School of Chosun University*

Dentin is a mineralized tissue formed by odontoblasts that are differentiated from ectomesenchymal cells. The molecular mechanism of differentiation in odontoblasts remains unclear. Amino acid transporters play an important role in supplying nutrition to normal and cancer cells including odontoblasts, and for cell proliferation. Amino acid transport system L is a major nutrient transport system responsible for the Na<sup>+</sup>-independent transport of neutral amino acids including several essential amino acids. The system L is divided into two major subgroups, the L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and the L-type amino acid transporter 2 (LAT2). In this study, the expression pattern and role of amino acid transport system L were, therefore, investigated in the differentiation of MDPC-23 cells derived from mouse dental papilla cells.

To determine the expression level of amino acid transport system L participating in intracellular transport of amino acids in the differentiation of MDPC-23 cells, it

was examined by RT-PCR, observation of cell morphology, Alizaline red-S staining and uptake analysis after inducing experimental differentiation in MDPC-23 cells. The results are as follows.

1. The LAT1 mRNA was expressed in the early stage of MDPC-23 cell differentiation. The expression level was gradually increased by time course and it was decreased after the late stage.
2. The LAT2 mRNA was not observed in the early stage of MDPC-23 cell differentiation. The LAT2 mRNA was expressed at the 11 days of MDPC-23 cell differentiation and the expression level was gradually decreased by time course.
3. There was no changes in the expression level of 4F2hc mRNA, the cofactor of LAT1 and LAT2, during the differentiation of MDPC-23 cells.
4. The expression of ON mRNA was gradually decreased but the expression of ALP mRNA was increased during differentiation of MDPC-23 cells.
5. The L-leucine uptake was increased by time course from the early stage to the 9 days in MDPC-23 cell differentiation. The amount of L-leucine uptake was maintained to the 11 and 14 days of MDPC-23 cell differentiation.

As the results, it is considered that among neutral amino acid transport system L in differentiation of MDPC-23 cells, the LAT1 has a key role in cell proliferation in the early stage and middle stage of cell differentiation and the LAT2 has an important role in cell differentiation and mineralization in the late stage of cell differentiation for providing cells with neutral amino acids including several essential amino acids.

# I. 서 론

치아의 형성은 치성상피(dental epithelium)와 외배엽성 간엽세포(ectomesenchymal cell) 사이의 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되어지는 복잡한 발생과정을 통해 이루어진다<sup>1)</sup>. 치성상피는 치아기(dental organ)를 형성하여 법랑질모세포를 분화시키는 반면에, 외배엽성 간엽세포는 치유두(dental papilla)를 형성하여 상아질모세포와 치수세포가 분화하고 이들이 치관 상아질과 치수를 형성한다. 또한 외배엽성 간엽세포는 치낭(dental follicle)을 형성하며 이 세포들이 백악질, 치주인대 및 치조골을 형성한다<sup>2,3)</sup>. 치관이 완성된 후에 내치상피(internal dental epithelium)와 외치상피(external dental epithelium)가 치관 아래쪽으로 증식하여 Hertwig 상피 근초(Hertwig's epithelial root sheath)를 형성하며, Hertwig 상피 근초가 치근의 형태를 결정하고 치근 상아질을 형성하는 상아질모세포의 분화를 유도한다<sup>4)</sup>.

상아질모세포는 제 I 형과 II형 교원질과 같은 유기기질과 당단백 및 dentin sialophosphoprotein(DSPP)을 합성하고 분비한다<sup>5)</sup>. 상아질의 기질이 침착됨에 따라 상아질모세포가 세포질 돌기들을 원심 쪽으로 내어 상아세관에 묻히게 되고, 결과적으로 상아질모세포는 치수 가장자리 상아질의 내면에 위치하여 상아질을 유지하게 된다<sup>6)</sup>. 그러나 이러한 상아질모세포의 정확한 분화기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

상아질모세포는 치아 이외의 일반적인 세포들(상피세포, 결합세포 등)과는 달리 많은 유기기질 및 무기질을 생성하고 분비하여야 한다. 따라서 이를 위한 다양한 영양물질들을 세포 내로 이동시킬 수 있는 영양물질 수송체의 발현이 매우 중요하다고 사료되지만 이에 관한 연구는 없었다. 또한 상아질모세포에서는 분화를 위한 세포 내 화학적·물리적 신호와 세포의 증식을 위한 단백질 합성에 필수적인 아미노산들의 세포 내 유입이 증가하여야 할 것이다. 세포 내로의 아미노산 수송 증가는 아미노산을 수송할 수 있는 아미노산 수송체의 과발현에 의해 유도될 것으로 생각되나 이와 관련된 보고 또한 없었다.

아미노산은 단백질 합성의 기질이 되는 기능 이외에도 포도당, 퓨린, 피리미딘 등 많은 생체분자들의 합성을 위한 전구물질이므로 생체 내 필수 영양물질 중의 하나이다<sup>7)</sup>.

생체분자의 생합성 반응은 주로 세포 내에서 이루어지고 아미노산은 세포막을 투과하기 어려운 친수성 물질이므로, 세포는 아미노산을 세포 밖에서 세포 안으로 수송하기 위한 수송 단백질인 아미노산 수송체를 세포막에 필수적으로 보유해야 한다<sup>7)</sup>.

세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 지속적인 증식과 성장이 필수적인 세포들에는 아미노산 수송체의 기능이 상승되어 단백질 합성을 위한 아미노산의 공급이 활발하고, 이는 이들 세포 내 아미노산의 공급을 위한 아미노산 수송체들의 발현이 특이적으로 과발현(overexpression) 됨에 의해서 이루어진다고 알려져 있다<sup>7,8)</sup>.

아미노산 수송체는 각기 그들이 수송하는 아미노산 종류가 다르며, 그 특성에 따라 중성, 염기성 및 산성 아미노산 수송체로 분류한다<sup>7)</sup>. 또 아미노산 수송체는 그들이 기질을 수송할 때의  $\text{Na}^+$  의존적 유무에 따라,  $\text{Na}^+$ -의존적과  $\text{Na}^+$ -비의존적 아미노산 수송체로 분류하기도 한다.

아미노산 수송계 L은  $\text{Na}^+$ -비의존적으로 중성 아미노산을 주로 수송하는 세포막 단백질로 종양 세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성 아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송체로 알려져 있다<sup>7,8)</sup>. Kanai 등(1998)<sup>8)</sup>에 의해 아미노산 수송계 L의 첫 번째 아형인 아미노산 수송체 L-type amino acid transporter 1(LAT1)이 C6 rat glioma cell에서 동정되었다. LAT1은 12회 세포막을 관통하는 막 단백질로서  $\text{Na}^+$ -비의존적으로 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, methionine과 histidine같은 구조가 큰 중성 아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다<sup>8-10)</sup>. LAT1은 4F2 heavy chain(4F2hc)이라는 1회 세포막을 관통하는 막 단백질과 disulfide 결합을 가진 heterodimer형 막 단백질이며, LAT1이 기능을 나타내기 위해서는 보조인자 4F2hc의 존재가 필수적이다<sup>8-11)</sup>. 중성 아미노산 수송체 LAT1은 종양세포와 같이 세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 지속적인 증식과 성장이 필수적인 세포에서 과발현되어 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>8,9,12,13)</sup>. 한편, LAT1의 분자생물학적 동정 후에 아미노산 수송계 L의 두 번째 아형인 L-type amino acid transporter 2(LAT2)가 동정되었다<sup>14-17)</sup>. LAT2는 구조적으로 LAT1과 매우 유사하며,  $\text{Na}^+$ -비의존적으로 다수의 필수아미노산을 포함하는 중성 아미노산을 수송한다<sup>14-17)</sup>. LAT1이 구조가 큰 중성 아미노산 만을 수송하는 특징을 보이는 반면, LAT2는 구조

에 관계없이 중성아미노산을 모두 수송하는 넓은 기질특이성을 지니고 있다<sup>8-10,14-17</sup>).

아미노산 중 필수아미노산은 세포 자신이 합성하지 못하므로 세포 외로부터 세포 내로 수송되어야 한다<sup>7</sup>). 생체 내 아미노산 수송체들의 역할은 모두 중요하지만, 그 중에서 특히 아미노산 수송계 L은 그 수송기질이 필수아미노산을 포함한 대부분의 중성 아미노산이므로 매우 중요하게 인식되고 있다<sup>8,9,12,13</sup>). 상아질모세포의 증식과 분화과정에서도 아미노산 수송계 L을 포함한 아미노산 수송체들의 과발현 현상이 나타나리라 사료되지만 이와 같은 아미노산 수송체들의 발현에 관한 실험적 증거 및 분자생물학적인 기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다.

MDPC-23 세포주는 Hanks 등(1998)<sup>18,19</sup>이 CD-1 생쥐 어금니의 치유두를 이용하여 만든 세포주로서, 일정조건에서 배양하면 상아질모세포의 특성을 나타낸다는 것을 확인<sup>20</sup>한 세포주이다.

따라서 본 연구에서는 배양 상아질모세포의 분화과정에서 아미노산 수송계 L의 발현양상을 분석하여 상아질모세포의 분화과정에서 아미노산 수송계 L의 역할을 밝히고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

[<sup>14</sup>C]L-leucine은 Perkin Elmer Life Science Inc.(Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 아미노산 및 기타 시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

### 2. 상아질모세포의 배양과 분화

본 연구에서는 생쥐 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주<sup>18,19)</sup>를 실험에 이용하였다. MDPC-23 세포주를 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제(penicillin 100IU/ml, streptomycin 100 $\mu$ g/ml, gentamycin 50 $\mu$ g/ml, fungizone 2.5 $\mu$ g/ml)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM)에 배양하였으며, 세포분화와 석회화유도를 위하여, 동일배지에 ascorbic acid(50 $\mu$ g/ml)와  $\beta$ -glycerophosphate(10mM)를 첨가하여 배양하면서 실험에 이용하였다<sup>21)</sup>.

### 3. 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석

세포분화와 석회화가 유도된 각각의 MDPC-23 세포주에서 TRI REAGENT kit(Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrometer)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정, 추출된 RNA의 농도를 계산하였다. cDNA를 합성하기 위하여 5 $\mu$ g의 total RNA를 reverse-transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 oligo(dT) primer를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA를 LAT1, LAT2, 4F2hc, osteonectin(ON) 및 alkaline phosphatase(ALP) 등의 primer(Table 1)를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다. PCR 반응 조건은

*Table 1. Primer sequences for PCR*

<i>Primer Names</i>	<i>Sequence (5'→3')</i>	<i>PCR Product (bp)</i>
LAT1 (sense)	CAGCTCCCTGAGTATGAAAG	499
LAT1 (antisense)	ATCCTCAGGACATCACAAAC	
LAT2 (sense)	TCAGCTGGAGAGACTCAGAT	500
LAT2 (antisense)	ATCCTTCATACCTGGTCCTT	
4F2hc (sense)	AAGGAGGAGCTACTGAAGGT	497
4F2hc (antisense)	ATTTTGGTGGCTACAATGTG	
ON (sense)	ACATGGGTGGACACGG	405
ON (antisense)	CCAACAGCCTAATGTGAA	
ALP (sense)	TGGCCAAGAAGACAGTAAGT	321
ALP (antisense)	GCCTTATTTTCATTTTCGATG	
GAPDH (sense)	TGCATCCTGCACCACCAACT	349
GAPDH (antisense)	CGCCTGCTTCACCACCTTC	

LAT1: L-type amino acid transporter 1

LAT2: L-type amino acid transporter 2

4F2hc: 4F2 heavy chain

ON: osteonectin

ALP: alkaline phosphatase

94°C에서 효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 12분, 변성(denaturation)반응을 94°C에서 1분, 결합(annealing)반응을 50~55°C에서 30초, 중합(extension)반응을 72°C에서 1분간 40주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 각 primer의 T<sub>m</sub> 값을 고려하여 LAT1, 4F2hc 및 GAPDH의 결합반응 온도는 54°C, LAT2와 ON의 결합반응 온도는 52°C, ALP의 결합반응 온도는 55°C로 시행하였다. RT-PCR 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 각각의 PCR product를 확인하였다.

#### 4. Alizaline red-S 염색

MDPC-23 세포주의 석회화 결절을 확인하기 위하여 Alizaline red-S 염색을 시행하였다. 분화를 유도한 MDPC-23 세포주를 PBS로 3회 세척한 후, 70% ethyl alcohol로 20분 동안 고정한 다음 0.1% NH<sub>4</sub>OH가 함유된 1% Alizaline red-S(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 5분간 염색하여 관찰하였다.

#### 5. Uptake 실험

분화를 유도한 MDPC-23 세포주들에서 아미노산 수송체 L의 특성을 조사하기 위하여 Kim 등(2002)<sup>22)</sup>의 방법을 이용하여 아미노산 uptake 실험을 시행하였다.

37°C의 성장배지가 함유된 6 well plate에서 배양된 각 분화시기별 MDPC-23 세포주를 uptake 실험에 이용하였다. 성장배지를 흡수기를 이용하여 제거한 뒤 세포를 Na<sup>+</sup>-free uptake 용액(125mM choline-Cl, 4.8mM KCl, 1.3mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 25mM HEPES, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6mM glucose, pH 7.4)을 사용하여 3회 세척한 후 10분간 전배양 하였다. 그 후, [<sup>14</sup>C]L-leucine 30μM이 존재하는 동일 uptake 용액으로 교체하여 2분 배양시켰으며, 반응의 정지를 위해 4°C의 같은 용액으로 3회 세척하였다. 세척 후 세포를 0.1N NaOH에 녹여 세포 안으로 uptake 되어진 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며, 측정된 방사능을 pmol/mg



protein/min으로 산출하였다. 본 논문의 uptake 실험에서 각각의 결과를 위해 각 군은 4개의 well을 이용하였으며, 각각의 결과를 mean  $\pm$  SEM으로 표시하였다. 각 결과의 재현성을 확인하기 위하여 4회 이상 반복 실험을 수행하여 결과를 산출하였다. 본 논문의 실험대상이 되는 아미노산 수송계 L에 의한 중성 아미노산들의 수송은 Na<sup>+</sup>-비의존적으로 이루어짐으로, 본 논문의 모든 uptake 실험은 Na<sup>+</sup>-free uptake 용액에서 시행하여 비교하였다<sup>8-10,14-17</sup>.

## 6. 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean  $\pm$  SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만(p<0.05)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 배양 상아질모세포 분화과정에서 아미노산 수송체 L의 발현

생쥐 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주에 ascorbic acid와  $\beta$ -glycerophosphate를 첨가하여 석회화 결절의 형성을 유도한 28일간의 배양과정에서 아미노산 수송체 L의 아형인 LAT1과 LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc mRNA의 발현을 확인하기 위해, 각각의 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. MDPC-23 세포주에서 아미노산 수송체 LAT1의 발현을 배양 시간별로 관찰하면, 배양 0일째부터 세포들에서 LAT1의 발현이 관찰되었고, 배양 4일째에서 0일째의 발현양인 GAPDH 대비 12%에서 LAT1의 발현이 23%로 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 배양 9일째에서도 LAT1의 발현양이 증가하여 GAPDH 대비 38%까지 증가하였으며, 배양 11일, 14일, 21일 및 28일로 경과하면서 LAT1의 발현이 점차 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 아미노산 수송체 LAT2의 발현은 배양 0일째의 대조군, 2일, 4일, 7일 및 9일째까지 관찰되지 않았으나, 배양 11일째부터 관찰되었다(Fig. 2). 배양 11일과 14일째에는 GAPDH 대비 27%와 28%의 발현이 관찰되어 최대의 발현을 보였다(Fig. 2). LAT2의 발현은 배양 21일째와 28일째로 진행하면서 점차 감소하였다(Fig. 2). LAT1과 LAT2의 기능에 필수적 보조인자인 4F2hc의 발현은 배양 0일부터 28일째까지 비슷한 경향을 보였다(Fig. 3).

#### 2. 배양 상아질모세포 분화과정에서 분화 특이유전자의 발현

MDPC-23 세포주를 분화유도 후, 실험적으로 분화가 유도되었는지 확인하기 위해, MDPC-23 세포주의 분화에 의해 특이적으로 발현이 감소 또는 증가되는 유전자들인 ON과 ALP의 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 본 연구에서 MDPC-23 세포주에서 분화를 유도한 후 시간이 경과함에 따라 ON의 발현이 감소하

는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). ON은 배양 0일째인 대조군에서 GAPDH 대비 140%의 발현을 보였으며, 4일째에서 40%, 7일째에서는 24%, 14일째에서는 22%, 21일째에서는 10%로 발현이 점차 감소함을 알 수 있었다(Fig. 4). ALP의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 점차 증가하였다(Fig. 5). 배양 0일, 2일 및 4일째까지는 ALP의 발현을 관찰할 수 없었으나, 7일째부터 GAPDH 대비 32%의 발현을 보이기 시작하여 14일째에서는 126%, 21일째에서는 141%의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 이 실험들의 결과로, 본 실험에서 분화유도 시킨 MDPC-23 세포주는 분화배지에 의해 정상적인 분화가 유도되었음을 확인할 수 있었다.

### 3. 배양 상아질모세포 분화과정에서 세포형태의 변화

상아질모세포의 분화과정에서 세포형태의 변화를 관찰하였다. 배양 2일째부터 상아질모세포의 증식이 관찰되었으며(Fig. 6B), 배양 4일째에는 세포가 더욱 증식하여 세포 밀도의 증가와 함께 세포형태의 변화가 관찰되었다(Fig. 6C). 배양 7일째에는 여러 층의 세포와 결절들이 관찰되었으며(Fig. 6D), 특히 배양 4일과 7일 사이에 세포의 증식이 급격히 증가하여 고밀도의 세포와 흰 결절들이 관찰되기 시작하였다. 배양 9일째에는 배양 7일째부터 관찰되던 흰 결절들의 크기가 증가하는 것을 보였으며(Fig. 6E), 배양 14일째에는 흰 결절들의 밀도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6F). 배양 7일에서 14일까지의 기간에서 흰 결절들이 육안으로 확인되었으며, 이 시기의 세포형태는 배양 초기의 세포형태와 많은 차이가 있었다. 배양 21일과 28일에서는 흰 결절들이 더욱 결집하여 크기가 더욱 증가하였다(Fig. 6G, Fig. 6H).

### 4. 배양 상아질모세포 분화과정에서 석회화 결절의 형성

상아질모세포 분화과정에서 석회화 결절의 형성을 확인하기 위하여 배양 14일과 21일 후, Alizaline red-S 염색을 시행하였다. 배양 14일째에는 흰 결절들이 육안으로 관찰되었으며(Fig. 6F), 배양 21일째부터는 크기가 증가하고 결집된 여러 층의 흰색 결절

을 관찰할 수 있었다(Fig. 6G). 흰색의 결절들을 Alizaline red-S 염색을 통하여 확인한 결과, 석회화 결절임을 확인할 수 있었다(Fig. 7A, Fig. 7B).

##### 5. 배양 상아질모세포 분화과정에서 [ $^{14}$ C]L-Leucine의 수송특성

상아질모세포 분화과정에서 아미노산 수송특성을 조사하기 위하여, 중성아미노산 중 실험적으로 가장 많이 이용되는 [ $^{14}$ C]가 표지된 L-leucine을 이용하여 uptake실험을 시행하였다. 배양 0일째인 대조군에서 L-leucine uptake 양은  $747 \pm 88$  pmol/mg protein/min이었으며, 배양 2일째에서는  $816 \pm 30$  pmol/mg protein/min으로 별다른 변화를 보이지 않았다(Fig. 8). 배양 4, 7 및 9일째에는 각각  $1323 \pm 69$ ,  $1642 \pm 158$  및  $1814 \pm 144$  pmol/mg protein/min으로 L-leucine uptake 양이 점차 증가하였고, 배양 9일째에서 L-leucine uptake 양이 최고치를 나타내었으며, 그 최고치는 배양 11일과 14일까지 유지되었다(Fig. 8).

## IV. 총괄 및 고안

상아질모세포의 분화과정은 다양한 세포기질분자, 신호전달물질, 성장인자 및 여러 수용체들이 관여하는 고도로 조직화된 과정이다<sup>23-25</sup>. 상아질모세포의 분화에 관련된 인자들로는 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )<sup>26</sup>나 dentin matrix protein 1 (DMP1)<sup>27,28</sup> 등이 현재까지 알려져 있으나, 이들은 뼈모세포를 포함한 경조직의 형성에 전반적으로 관여하는 인자들로서 상아질모세포의 분화에 선택적으로 관여하는 인자는 아닌 것으로 간주되고 있다. 또한, 최근에 DSPP 유전자가 소실되면 상아질의 석회화 과정에서 석회소구(calcospherite)의 융합(coalescence)이 이루어지지 않거나 치수실(pulp chamber)이 커지고 풋상아질(predentin)의 두께가 넓어지며 저석회화(hypomineralization) 및 치수노출이 일어날 수 있다고 하였으나, 이 과정에서도 상아질모세포의 분화와 성숙과정은 정상적으로 진행된다고 하여<sup>29</sup> DSPP가 상아질모세포의 분화를 직접 조절하는 인자는 아닌 것으로 간주되고 있다. 이와 같은 다양한 연구에도 불구하고 상아질모세포의 분화과정이나 상아질의 형성과정과 관련된 분자생물학적 기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 상아질모세포의 분화과정 시 필수적인 생체 영양물질인 아미노산들의 세포 내 수송에 관여하는 아미노산 수송체 L의 발현양상 및 역할을 밝히기 위해, 생쥐 치유두세포 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주를 실험적으로 분화유도 후, 아미노산 수송체 L의 발현을 관찰하고 아미노산 수송분석을 시행하였다.

아미노산 수송체들의 발현을 조사하는 RT-PCR 분석을 통해, MDPC-23 세포주에서 아미노산 수송체 LAT1 mRNA 발현은 배양 4일, 7일 및 9일로 시간이 경과하면서 점차 증가하였으며, 배양 11일, 14일, 21일 및 28일로 경과하면서 점차 감소하였다(Fig. 1). 아미노산 수송체 LAT2의 발현은 배양 0일째의 대조군, 2일, 4일, 7일 및 9일째까지 관찰되지 않았으나, 배양 11일째부터 관찰되었으며, 배양 21일과 28일째로 진행하면서 점차 감소하였다(Fig. 2). 아미노산 수송체 L의 첫 번째 아형인 LAT1은 정상 조직에서는 뇌, 태반, 정소 등 그 발현하는 부위가 매우 제한되어 있다<sup>8,9</sup>. 또한 LAT1은 종양세포에서 과발현되며, 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다

8,9,12,13). 아미노산 수송체 L의 두 번째 아형인 LAT2는 대부분의 사람 장기에서 발현하고 있으며, 특히 심장, 뇌, 태반, 신장, 비장, 전립선, 정소, 난소, 림프절 및 태아의 간 등에서 많은 발현을 하고 있다<sup>14-17)</sup>. 사람의 신장암 세포인 T24 세포<sup>19)</sup>와 사람의 구강 편평세포암종 KB 세포<sup>30)</sup>에서도 LAT1의 발현을 확인할 수 있었으나 LAT2의 발현은 관찰할 수 없었다. 본 연구에서도 상아질모세포의 분화과정 중 아미노산 수송체 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2는 그 발현시기 및 발현양에서 차이를 보였다. About등(2000)<sup>31)</sup>과 Papagerakis 등(2002)<sup>32)</sup>은 상아질모세포에서 실험적인 분화를 유도하여 석회화 결절을 형성시킨 실험에서 분화과정 중 DSPP와 ON 등의 유전자들의 발현이 증가 또는 감소하여 석회화 결절의 형성에 기여한다고 보고하였다. 이 같은 선행연구자들의 보고들<sup>31,32)</sup>은 분화시기별로 중요한 역할을 하는 유전자와 단백질들이 서로 다르다는 것을 시사한다. 따라서 LAT1과 LAT2가 상아질모세포의 분화과정 중 시기별로 발현양상과 발현양이 서로 다르다는 것을 확인한 본 연구결과와 분화시기별로 중요한 역할을 하는 유전자와 단백질들이 서로 다르다는 것을 시사한 선행연구자들의 보고<sup>31,32)</sup>를 같이 고찰하여 볼 때, 상아질모세포의 분화유도 후 석회화 결절을 형성하는 과정에서 중성아미노산 수송체 LAT1은 상아질모세포의 석회화 결절 과정에서 초반기와 중반기에, 중성아미노산 수송체 LAT2는 석회화 결절 과정에서 중반기 이후에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

아미노산 수송체 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2의 기능을 위한 필수적인 보조인자인 4F2hc 발현은 MDPC-23 세포주의 분화과정 동안 발현의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 이는 LAT1과 LAT2는 분화과정 동안 그 발현양이 조절되지만, 4F2hc는 그들의 보조인자로 필수적이기 때문에 발현양의 변화가 관찰되지 않은 것으로 사료된다.

본 연구에서 MDPC-23 세포주의 분화를 유도한 후 ON mRNA의 발현은 배양 4일째부터 현저하게 감소하기 시작하였으며, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다(Fig. 4). 이 결과는 ON mRNA가 배양 초기에는 발현이 유지되다가 점차 그 발현이 현저히 감소한다는 결과를 보고하여, ON이 상아질모세포의 초기분화과정이나 상아질이 석회화되기 전 단계인 풋상아질에서 발현된다고 한 Papagerakis 등(2002)<sup>32)</sup>의 연구결과와 일치한다. 또한 본 연구에서 ALP mRNA 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정

초기에는 관찰할 수 없었으나 배양시간이 경과하면서 점차 증가하였다(Fig. 5). 이 결과는 치주인대섬유모세포의 분화유도 과정에서 ALP mRNA 발현이 배양초기에는 관찰되지 않았으나 배양시간이 경과할수록 점차 증가한다는 Foster 등(2006)<sup>33)</sup>의 연구결과와 유사하였다. 따라서 본 연구의 MDPC-23 세포주에서 ON과 ALP mRNA 발현 실험결과들은 MDPC-23 세포주의 실험적인 분화가 정상적으로 이루어졌음을 뒷받침하고 있다. 또한 분화 중인 MDPC-23 세포주의 형태학적인 관찰(Fig. 6)과 석회화 결절 형성을 확인하기 위한 Alizaline red-S 염색(Fig. 7)을 통해서도 석회화 결절 및 분화중인 세포와 기질들을 관찰할 수 있었다.

MDPC-23 세포주의 분화과정에서 아미노산 수송특성을 조사하기 위하여, 중성아미노산 L-leucine을 이용하여 uptake실험을 시행한 결과, 배양 4일부터 L-leucine uptake가 증가하기 시작하여 배양 9일째에 최대를 보였으며 배양 14일까지 L-leucine uptake 양을 유지하였다(Fig. 8). Yoon 등(2005)<sup>34)</sup>은 사람의 정상 구강편평상피세포와 사람의 구강편평세포암종에서 아미노산 수송체 L의 발현 및 역할을 밝힌 연구에서, 정상세포주인 구강편평상피세포에서는 LAT2만 발현하고 암세포주인 구강편평세포암종에서는 LAT1만 발현하여 각각의 세포에서 중성아미노산의 세포 내 유입역할을 담당한다고 보고하였으며, 구강편평세포암종에서 LAT1에 의해 유도되는 L-leucine uptake 양이 구강편평상피세포에서 LAT2에 의해 유도되는 L-leucine uptake 양보다 동일한 조건에서 많다는 것을 보고하였다. 본 연구의 MDPC-23 세포주 분화과정에서는 시기에 따라 발현하는 아미노산 수송체 L의 아형이 서로 달랐으며, LAT2는 발현하지 않고 LAT1의 발현이 점차 증가하는 배양 9일까지 L-leucine uptake 양 또한 점차 증가하였으며, LAT2가 발현하기 시작하고 LAT1의 발현이 점점 감소하기 시작하는 배양 11일과 14까지 L-leucine uptake 양을 유지하였다. 이러한 결과는 MDPC-23 세포주 배양 9일까지는 LAT1의 발현증가에 의해 L-leucine uptake 양이 증가하며, 배양 11일과 14일에는 LAT1의 발현은 약간 감소하지만 상대적으로 LAT2가 발현되어 LAT1과 LAT2가 모두 기능을 하여 L-leucine uptake 양이 감소하지 않고 유지하는 것을 의미한다. 본 연구에서의 L-leucine uptake 결과와 Yoon 등(2005)<sup>34)</sup>의 연구결과로 볼 때, 이 연구에서 MDPC-23 세포주의 분화유도 후 석회화 결절을 형성하는 과정에서 중성

아미노산 수송체 L 중, LAT1은 상아질모세포의 석회화 결절 과정에서 초반기와 중반기에 중성아미노산을 세포 내로 유입시키는 역할을 하며, 중성아미노산 수송체 LAT2는 석회화 결절 과정에서 중반기 이후에 중성아미노산을 세포 내로 유입시키는 역할을 한다고 사료된다.

세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 지속적인 성장, 증식 및 분화가 일어나는 세포들에서는 아미노산 수송체들의 기능이 상승되어 단백질 합성을 위한 아미노산 공급이 활발하게 되며, 이는 이들 세포 내 아미노산의 공급을 위한 아미노산 수송체들의 발현이 특이적으로 과발현 됨에 의해서 이루어진다고 알려져 있다<sup>8,9,12,13</sup>. 아미노산 수송체 L은 그 수송 기질이 필수아미노산을 포함한 대부분의 중성아미노산이므로 매우 중요하게 인식되고 있다<sup>7,8</sup>. 본 연구에서 LAT1은 MDPC-23 세포주의 배양 초기에 발현이 나타나 분화가 진행됨에 따라 점차 발현이 증가하다 배양 11일 이후부터 그 발현이 감소하였으며, LAT2는 분화유도 중기 이후에 발현되는 것을 알 수 있었다. 또한 이전 연구자들은 MDPC-23 세포주를 이용하여 석회화 결절을 유도한 후 상아질모세포의 특성을 나타내는 시기를 분석하여, 치유두 세포주인 MDPC-23 세포주가 분화를 유도하는 실험적 조건에서 배양 14일 정도가 되어서야 비로소 상아질모세포의 특성을 나타낸다고 보고하였다<sup>29</sup>. 따라서 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주 분화과정에서 아미노산 수송체 L 중, LAT1은 상아질모세포의 석회화 결절 과정에서 초반기와 중반기의 세포증식에 중요한 역할을 하며, LAT2는 석회화 결절 과정에서 세포증식 이후의 세포분화 및 석회화 결절형성에 중요한 역할을 한다고 사료된다.



## V. 결 론

상아질모세포의 분화과정 시 필수적인 생체 영양물질인 아미노산들의 세포 내 수송에 관여하는 아미노산 수송계 L의 발현양상 및 역할을 밝히기 위해, 생쥐 치유두세포 유래의 MDPC-23 세포주에서 실험적 분화를 유도한 후, RT-PCR 분석, 세포형태 관찰, Alizaline red-S 염색 및 L-leucine uptake 분석실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MDPC-23 세포주의 배양 초기에 LAT1 mRNA가 발현되었고, 그 발현은 시간이 경과하면서 점차 증가하였으나, 배양 11일 이후부터 LAT1의 발현은 감소하였다.
2. LAT2 mRNA는 MDPC-23 세포주 배양 11일째부터 관찰되었다.
3. MDPC-23 세포주의 분화과정 동안 LAT1과 LAT2의 보조인자인 4F2hc mRNA 발현수준은 변화가 없었다.
4. MDPC-23 세포주의 분화과정에서 ON의 발현은 점차 감소하였으며, ALP의 발현은 점차 증가하였다.
5. MDPC-23 세포주의 분화과정에서 세포 내 L-leucine의 양이 배양 9일까지 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였으며, 그 L-leucine 양은 배양 11일과 14일까지 유지되었다.

본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주 분화과정에서 중성아미노산 수송계 L 중, LAT1은 상아질모세포의 증식과 분화초기에서, LAT2는 석회화 결절과정에서 세포증식 이후의 세포분화 및 석회화 결절형성에서 단백질 생합성을 위한 중성아미노산의 수송에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

## VI. 참고 문헌

1. Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. Arch Oral Biol 1987;32:123-127.
2. Chien HH, Lin WL, Cho MI. Expression of TGF-beta isoforms and their receptors during mineralized nodule formation by rat periodontal ligament cells *in vitro*. J Periodontal Res 1999;34:301-309.
3. D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions *in vivo*. J Bone Miner Res 1997;12:2040-2049.
4. Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. J Clin Periodontol 2004;31:184-192.
5. Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and *in vitro*-induced odontoblast differentiation. Int J Dev Biol 1994;38:405-420.
6. Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure and function. 6th ed., St. Louis, Mosby, 2003, pp 78-103.

7. Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 1990;70:43-77.
8. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Bio Chem* 1998;273:23629-23632.
9. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et. al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514:291-302.
10. Uchino H, Kanai Y, Kim DK, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, et. al. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanism of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 2002;61:729-737.
11. Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, et. al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 1999;274:3009-3016.
12. Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res* 1995;55:1152-1159.
13. Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other

primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res* 1996;56:5012-5022.

14. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 1999;274:19745-19751.
15. Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 2000;440:503-512.
16. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, et. al. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transporter activity with broad specificity for small large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1999;274:19738-19744.
17. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, et. al. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 1999;274:34948-34954.
18. Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci* 1998;106(Suppl 1):260-266.
19. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et. al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 1998;37:233-249.
20. Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Begue-Kirn C, Wataha JC, et. al.

Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res* 1998;37:251-261.

21. Shibuya N, Nemoto E, Kanaya S, Kunii R, Shimauchi H. Retinoic acid is a potential negative regulator for differentiation of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2005;40:432-440.
22. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, et. al. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1565:112-121.
23. Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *J Dent Res* 1990;69:75-81.
24. Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH. Six decades of dentinogenesis research. Historical and prospective views on phosphophoryn and dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci* 1998;106(Suppl 1):211-220.
25. Telles PD, Hanks CT, Machado MA, Nor JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res* 2003;82:466-470.
26. Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF-beta in induction of reparative dentinogenesis *in vivo*. *Eur J Oral Sci* 1998;106(Suppl 1):192-196.
27. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13625-13630.

28. Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4516-4521.
29. Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, et. al. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem* 2003;278:24874-24880.
30. Yoon JH, Kim YB, Kim MS, Park JC, Kook JK, Jung HM, et. al. Expression and functional characterization of the system L amino acid transporter in KB human oral epidermoid carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004;205:215-226.
31. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production *in vitro*. *Exp Cell Res* 2000;258:33-41.
32. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, et. al. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 2002;30:377-385.
33. Foster BL, Nociti FH Jr, Swanson EC, Matsa-Dunn D, Berry JE, Cupp CJ, et. al. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 2006;78:103-112.
34. Yoon JH, Kim IJ, Kim H, Kim HJ, Jeong MJ, Ahn SG, et. al. Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells. *Cancer Lett* 2005;222:237-245.

## VII. 사진부도 설명

Fig. 1. Detection of LAT1 mRNA by RT-PCR. The first stand cDNAs prepared from the MDPC-23 cell total RNAs were used as template for PCR amplification. The PCR products were electrophoresis on a 1.5 % agarose gel and visulaized with ethidium bromide. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells (LAT1; 499 bp, GAPDH; 349 bp) (0; 0 day after treatment with differentiation media, 2; 2 days after treatment with differentiation media, 4; 4 days after treatment with differentiation media, 7; 7 days after treatment with differentiation media, 9; 9 days after treatment with differentiation media, 11; 11 days after treatment with differentiation media, 14; 14 days after treatment with differentiation media, 21; 21 days after treatment with differentiation media, 28; 28 days after treatment with differentiation media) *B.* The percentage of LAT1 mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Fig. 2. Detection of LAT2 mRNA by RT-PCR. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells (LAT2; 500 bp, GAPDH; 349 bp) *B.* The percentage of LAT2 mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Other legends are the same as in Fig. 1.

Fig. 3. Detection of 4F2hc mRNA by RT-PCR. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells (4F2hc; 497 bp, GAPDH; 349 bp) *B.* The percentage of 4F2hc mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Other legends are the same as in Fig. 1.

Fig. 4. Detection of osteonectin (ON) mRNA by RT-PCR. *A*. Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells (ON; 405 bp, GAPDH; 349 bp) *B*. The percentage of ON mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Other legends are the same as in Fig. 1.

Fig. 5. Detection of alkaline phosphatase (ALP) mRNA by RT-PCR. *A*. Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells (ALP; 321 bp, GAPDH; 349 bp) *B*. The percentage of ALP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Other legends are the same as in Fig. 1.

Fig. 6. Change of cell morphology in MDPC-23 cells. The cell morphology in the differentiation media was examined after 2, 4, 7, 9, 14, 21 and 28 days of culture. The change of cell morphology during differentiation of MDPC-23 cells was investigated to inverted microscope 200 X or 400 X. *A*. The differentiating MDPC-23 cells on 6 cm cell culture dish. It took the photograph from the square zone. Differentiation pattern of MDPC-23 cells at 2 (*B*), 4 (*C*), 7 (*D*), 9 (*E*), 14 (*F*), 21 (*G*) and 28 (*H*) days after treatment with differentiation media. All scale bars indicated 50  $\mu\text{m}$ .

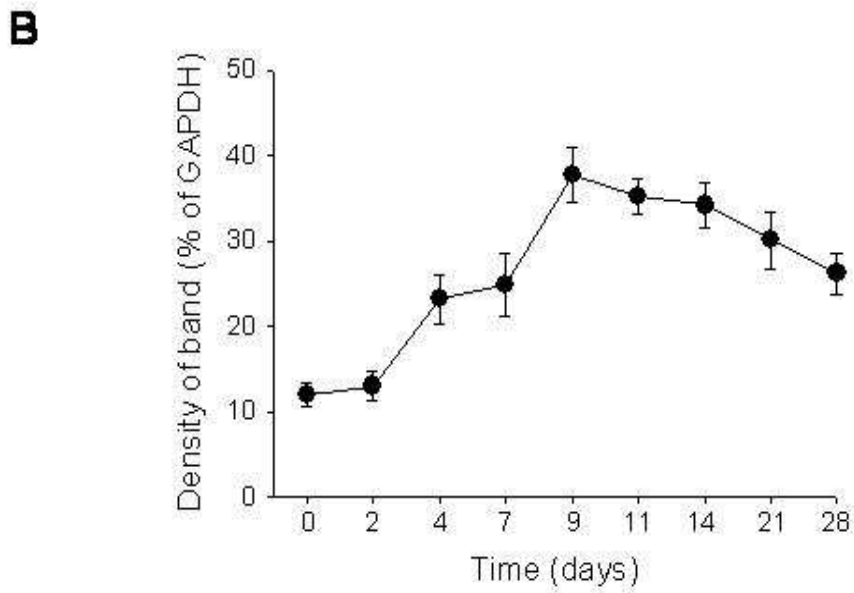
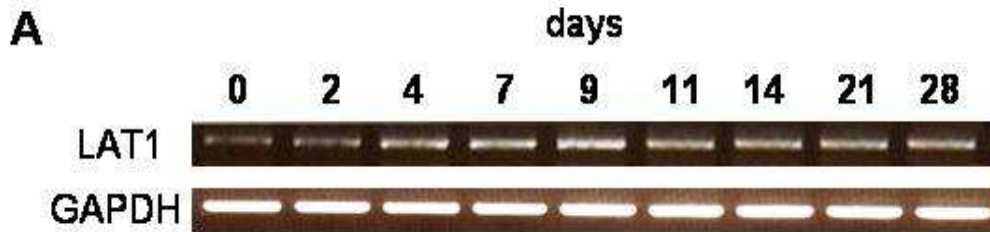
Fig. 7. Mineralized nodule formation in MDPC-23 cells. The mineralized nodule formation induced by the differentiation media was examined after 14 and 21 days of culture. The cells were grown in the presence of ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate for inducing the mineralization. The nodules were detected by Alizaline red-S staining. *A*. Mineralized nodule formation pattern of MDPC-23 cells at 14 days after treatment with differentiation



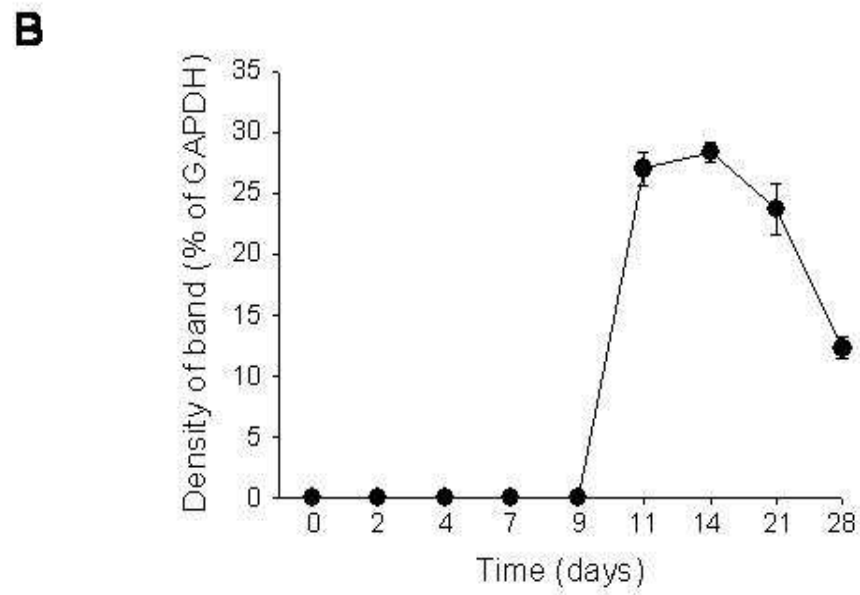
media. *B*. Mineralized nodule formation pattern of MDPC-23 cells at 21 days after treatment with differentiation media. All scale bars indicated 50  $\mu\text{m}$ .

Fig. 8. [ $^{14}\text{C}$ ]L-Leucine uptake by MDPC-23 cells. The [ $^{14}\text{C}$ ]L-leucine (30  $\mu\text{M}$ ) uptake measured at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 2 min in the  $\text{Na}^+$ -free uptake solution. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM of four experiments. \*\* $P < 0.01$  vs. 0 day (the MDPC-23 cells at 0 day after treatment with differentiation media) and \*\*\* $P < 0.001$  vs. 0 day.

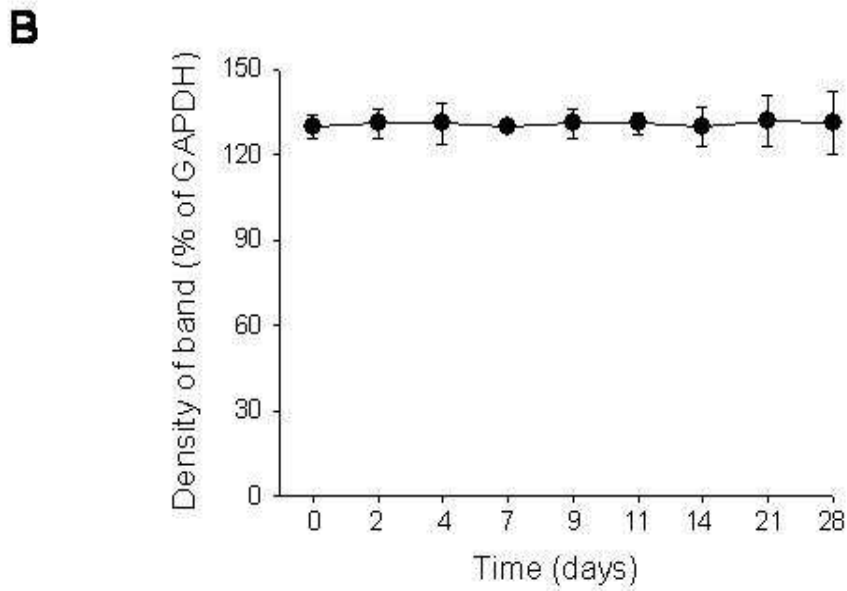
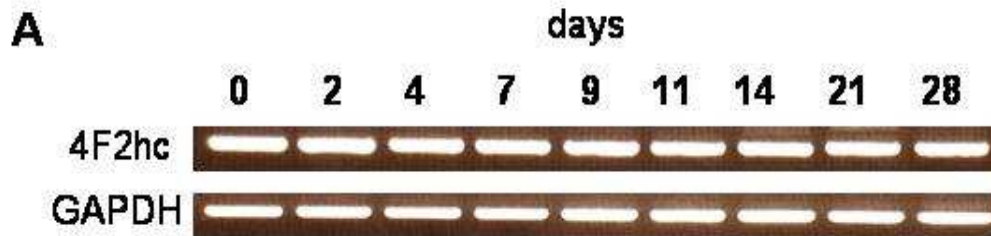
VIII. 안성민 사진부도(*Fig. 1*)



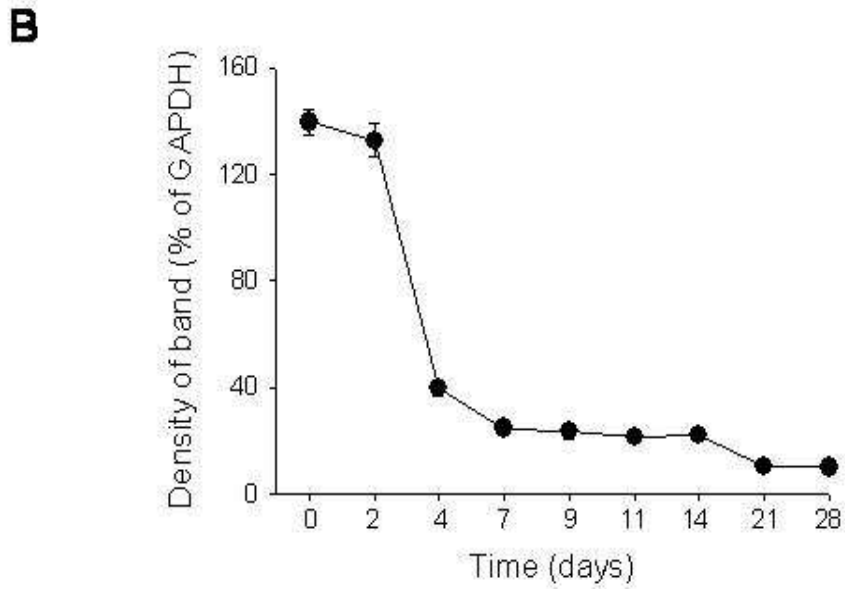
## VIII. 안성민 사진부도(*Fig. 2*)



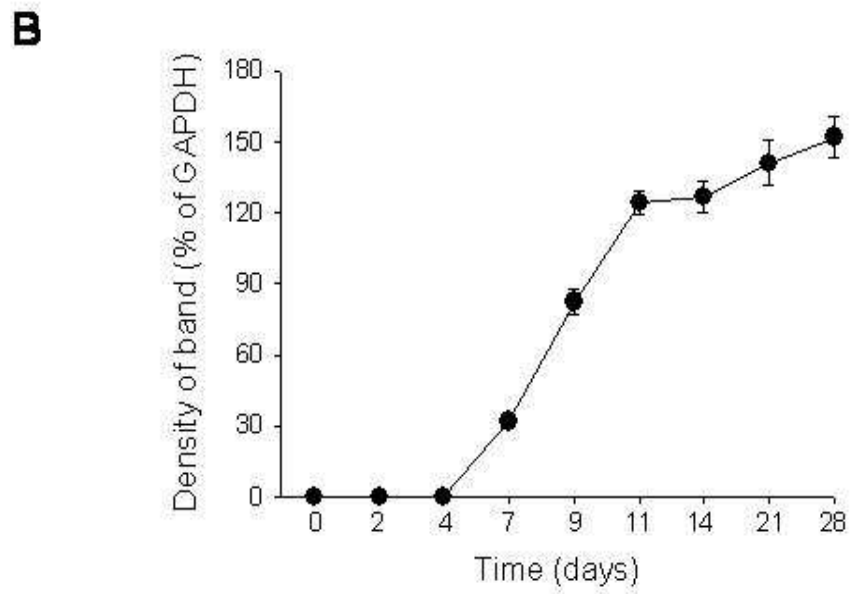
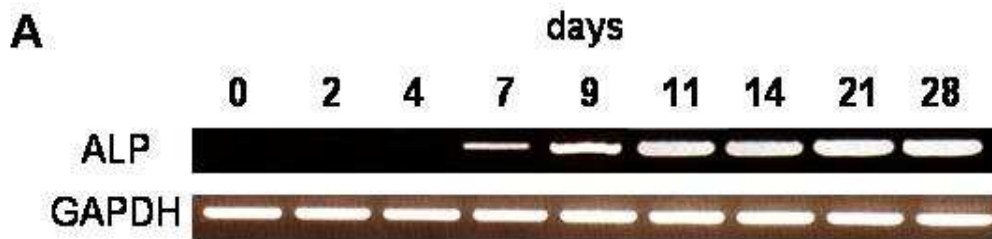
VIII. 안성민 사진부도(*Fig. 3*)



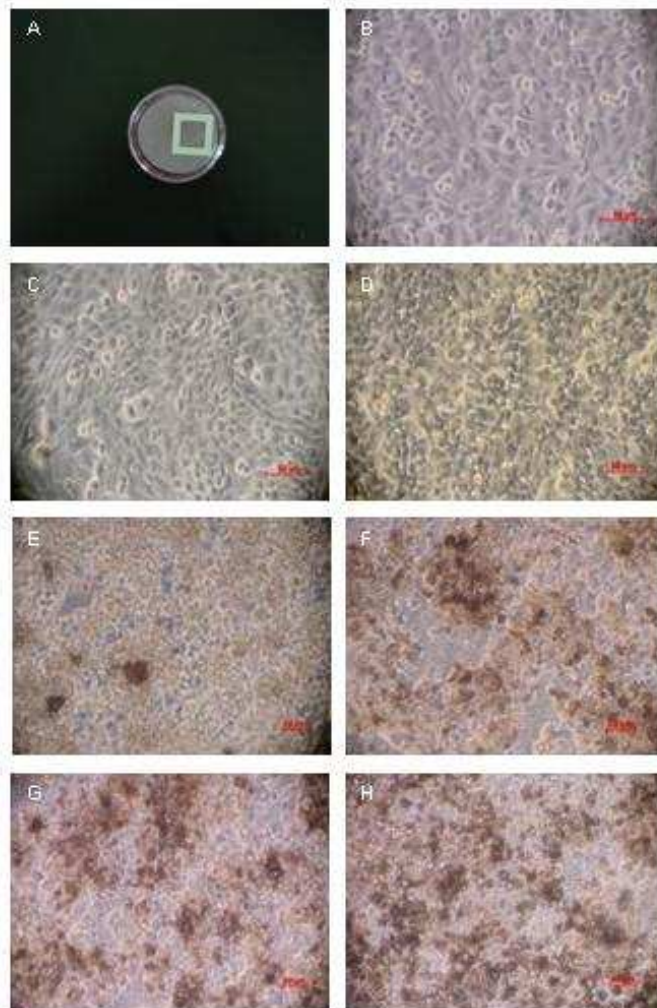
VIII. 안성민 사진부도(*Fig. 4*)



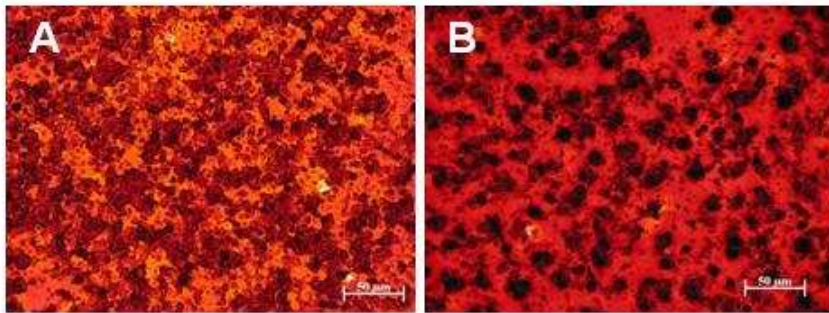
VIII. 안성민 사진부도(*Fig. 5*)



## VIII. 안성민 사진부도(Fig. 6)

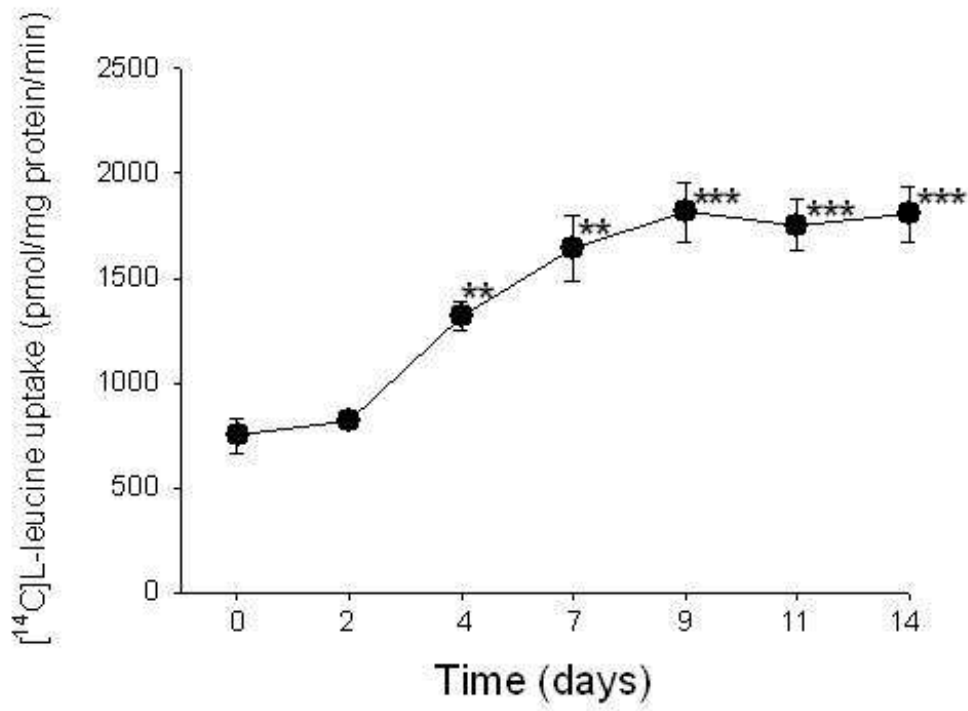


VIII. 안성민 사진부도(*Fig. 7*)





### VIII. 안성민 사진부도(Fig. 8)



## 저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20057487	과 정	박사
성 명	한글: 안 성 민                      영문: Ahn, Seong-Min				
주 소	139-241 서울특별시 노원구 공릉1동 567-5				
연락처	E-MAIL:				
논문제목	한글: 배양 상아질모세포 분화과정에서 아미노산 수송계 L의 발현 영문: Expression of amino acid transport system L during odontoblast differentiation				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 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 편집·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 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의( O )    반대(    )

2006년 12월    일

저작자:            안 성 민            (서명 또는 인)

**조선대학교 총장 귀하**