

생쥐 상아모세포 분화과정
에서 분비백혈구단백분해효소
억제제(SLPI)의 발현

Expression of the secretory leukocyte protease
inhibitor (SLPI) during mouse
odontoblast differentiation

2007년 2월 일

조선대학교 대학원

치의공학과

정 제 오

 조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



100373747 2007-04-09

생쥐 상아모세포 분화과정
에서 분비백혈구단백분해효소
억제제(SLPI)의 발현

지도교수 정 문 진

이 논문을 치의공학 박사학위신청 논문으로 제출함






2006년 10월 일

조선대학교 대학원

치의공학과

정 제 오

정제오의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	윤 창 룩	
위 원	인제대학교	교수	김 상 해	
위 원	조선대학교	교수	김 흥 중	
위 원	조선대학교	교수	김 도 경	
위 원	조선대학교	교수	정 문 진	

2006년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	v
I. 서 론	1
II. 실험재료 및 방법	4
1. 조직표본 제작	4
2. 항체 제작	4
3. 면역조직화학적 염색	5
4. <i>In-situ</i> hybridization	5
5. 교원질 염색	6
6. MDPC-23 배양 및 분화유도	7
7. 역전사 중합효소연쇄반응과 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 ..	7
III. 실험결과	10
1. 조직학적 관찰	10
1) 모자시기 및 종상기 초기	10
2) 종상기 후기	10
3) 치관기	10
4) 치아맹출기	11
2. MDPC-23 세포분화 과정 중 SLPI, DSPP, type I collagen mRNA의 발현	11
IV. 총괄 및 고안	12

V. 결 론	16
참고문헌	17
사진부도 설명	21
사진부도	23

표 목 차

Table 1. The summary of PCR primer sequences, annealing temperatures and amplification cycles	8
--	---

도 목 차

Fig. 1. Amino acid sequence of mSLPI	5
Fig. 2. Nucleotide sequence of the mSLPI cDNA	8
Fig. 3. Images of <i>in-situ</i> and immunostaining of early bell, bell, and advanced bell stage	23
Fig. 4. Images of crown Stage	24
Fig. 5. Images of functional Stage	25
Fig. 6. mRNA expression of SLPI, DSPP, and Col-I	26

ABSTRACT

Expression of the Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) during Mouse Odontoblast Differentiation

Jeong, Je-O

Advisor : Prof. Jeong, Moon-Jin, Ph.D.

Department of Dental Engineering,

Graduate School of Chosun University

The biological function of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is believed to be the inhibition of elastase, cathepsin G and other protease, thereby protecting tissue from self-degradation by these enzyme. Tooth development is associated with morphological and biochemical changes of the dental papilla and enamel organ. Among the proteins involved in the development, some proteases and inhibitors have important role for reorganization of the each developing cells. The SLPI is thought as a regulating protein on the synthesis and degradation of matrix proteins. But there was no report of expression of this molecule on the tooth development, especially on the odontoblast. Therefore, the aim of this study is to verify the role and expression of the SLPI during odontogenesis and mineralization during mouse tooth development.

From *in-situ* and immunohistochemical analysis, it has firstly described that the SLPI is expressed in odontoblasts during tooth

development. Expression of the SLPI was increased in differentiated odontoblast than that of young odontoblast and at the same time, collagen was also observed. Expression of the SLPI and type I collagen was also expressed during mineralization using MDPC-23 cells.

From these results, the expression of SLPI in odontoblast may prevent the degradation of collagen through the regulation of MMP, suggesting that the SLPI may play the important roles in odontogenesis and mineralization.

Key Words: Secretory leukocyte protease inhibitor, mouse tooth development, odontoblast, collagen, MDPC-23 cells

I. 서론

치아의 발생은 싹시기(bud stage), 모자시기(cap stage) 및 종시기(bell stage)의 세 단계로 진행된다. 싹시기의 치배(tooth germ)는 상피조직이 외배엽성간엽(ectomesenchyme) 쪽으로 돌출한 최초의 싹을 말하며, 상피싹 주변에 외배엽성간엽세포들이 치밀하게 모여있다. 모자시기는 상피조직이 외배엽성간엽 쪽으로 증식해가면서 상피 인접부위 외배엽성간엽세포의 밀도가 높아지게 되는 단계이다. 이 시기는 치아기관(dental organ), 치아유두(dental papilla), 치낭(dental follicle)으로 구성되어 세포증식이 일어나고 동일 상피세포들이 다른 세포들로 분화하는 조직분화가 일어난다. 모자시기 후반부터 분화가 시작되어 종시기 상피세포는 치아의 특이성을 갖는 세포 집단으로 변하게 된다. 종시기 후기에는 치판(dental lamina)이 파괴되고 상아질(dentin)과 법랑질(enamel)이 형성되기 시작한다. 상아질과 법랑질은 각각 인접한 세포인 상아모세포(odontoblast)와 법랑모세포(ameloblast)에 의해서 형성되고, 이 세포들은 외배엽성간엽(ectomesenchyme)과 구강상피(oral epithelium)에서 기원이 된다. 치아의 형성은 외배엽성간엽과 상피세포 사이의 복잡한 과정을 수반한 상호작용을 통해서 이루어진다(Theslef & Sharpe, 1997; Cobourne, 1999).

상아모세포는 치수(pulp) 주변을 둘러싸는 단일 층의 세포집단으로 상아질 내로 연장되는 상아질세관(dentinal tubules)이라 불리는 돌기를 갖는다. 상아모세포는 신경능선(neural crest)세포 유래의 외배엽성간엽세포에서 기원하며, 상아질의 유기기질을 합성, 분비하여 석회화에 관여한다(Lesot, 2000). 상아모세포는 상아질의 석회화를 결정하는 일련의 복잡한 과정을 조절하며, 풋상아질(predentin)에는 제 I형과 III형 교원질과 많은 막결합성 바탕질소포들(membrane-bound matrix vesicle)이 산재되어 있다. 상아모세

포에서 분비된 이 소포들은 주변 기관으로 이동하면서 상아질의 석회화 침착을 진행시킨다(Arana-Chavez & Massa, 2004). 상아질에는 석회화 침착의 촉진이나 억제에 관여하는 단백질들이 많이 발현되며, 그 종류로는 dentin sialophosphoprotein(DSPP), DSPP에 포함되는 deintin sialoprotein(DSP)와 dentin phosphoprotein(DPP) 그리고 dentin matrix protein 1, 2, 3(DMP1, DMP2, DMP3) 등이 있다(Begue-Kirn *et al.*, 1994).

분비백혈구단백분해효소억제제(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)는 11.7-kDa 크기의 cystein-rich 단백질로서, 침샘, 정장, 자궁경부, 비강 및 기관지 점액층에 있는 상피세포에서 분비되는 것으로 알려져 있다(Fritz, 1988; Jin *et al.*, 1997). SLPI의 단백질 구조는 N말단부터 C말단부위까지 신호펩타이드 부분과 분비펩타이드 부분으로 구성되어 있으며, 분비펩타이드의 앞쪽은 항세균 및 항염증관련 도메인이 위치하고, 뒤쪽부위에는 단백질분해효소억제 도메인이 있다.

SLPI의 단백질분해억제 기능은 염증질환과 퇴화되는 조직부위에서 중요한 방어분자로서 작용한다(McNeely *et al.*, 1995). 또한 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 자극된 대식세포에서 분비되고 LPS에 의해 활성화된 염증반응 관련 신호인자들에 대한 길항작용을 한다고 밝혀졌다(Fritz, 1988; Ohlsson *et al.*, 1988; Abe *et al.*, 1991). SLPI는 시험관(*in vitro*)과 생체(*in vivo*)에서 상처 치유와 세포의 증식을 촉진하고, HIV 바이러스와 박테리아 감염을 억제하는 기능도 있는 것으로 알려져 있다(Laurie *et al.*, 2002). 그리고 최근에는 SLPI가 암세포 전이 원인 인자중의 하나라는 연구결과도 보고되었다(Nick *et al.*, 2003).

현재까지 알려진 SLPI의 여러 가지 기능과 특징으로 미루어보아, SLPI가 치아 발생과정 중 기질을 구성하는 단백질의 형성과 분해과정을 조절하는 조절 단백질로서의 가능성이 있을 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구에서 치아발생과정 중 상아질 형성에 관여하는 상아모세포에서 SLPI의 역할을

알아보기 위해, 치아발생 단계별 SLPI의 발현 정도와 교원질의 분비를 비교 관찰 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 조직표본 제작

발생 18일, 생후 1일, 4일, 10일, 15일, 20일의 생쥐(Damool, KOR)를 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정시킨 후, 하악과두를 포함한 약골을 적출하여 4℃ paraformaldehyde 용액에서 16시간 재고정하였다. Phosphate Buffered saline(PBS, pH7.4)용액으로 2시간 세척하고, 10% disodium dihydrogen ethylene-diaminetetraacetate dihydrate(EDTA, pH 7.4) 용액에서 4주간 탈회하였다. 탈수를 위하여 70%, 80%, 90%, 100% I, 100% II, 100% III 및 100% IV 에탄올 처리를 각각 12시간씩 처리하였고, chloroform으로 투명화 과정을 거친 후, 파라핀을 침투시켜 포매 하였다. 조직을 5 μ m의 절편으로 만든 후 ethoxysilane(Sigma, USA)으로 코팅된 유리 슬라이드에 올려서 관찰하였다.

2. 항체 제작

펩타이드(EGGKNDAIKIGAC)는 생쥐 SLPI(mSLPI) 단백질의 폴리펩타이드에서 선택하였다(Fig. 1). 선택한 SLPI 펩타이드를 자동 펩타이드 합성기를 이용하여 제조하였다(Takara, Inc., KOR). 합성한 SLPI 펩타이드항체를 항체제작을 위해 토끼의 림프절에 주입해 첫 번째 면역반응을 일으켰고, 3주 후에 두 번째 면역반응을 수행 하였으며 10일 후 세 번째 면역반응을 거치고 난 뒤 20일 후에 친화성 크로마토그래피 방법을 이용하여 생성된 SLPI 항체를 정제하였다.

NH2- **Signal Peptides Region(1-25)** **Secreted Peptides Region**
 MKSCGLLPFTVLLALGILAPWTV**EGGKNDAIKIGAC**PAKKPAQC
 LKLEKPCQRTDWECPGKQRCCQDACGSKCVNPVPIRKPVWRKPGRCV
 KTQARCMMLNP PNVCQRDQCDGKYKCCEGICGKVCLPPM
 -COOH

Fig. 1. Amino acid sequences of mSLPI. Rabbit polyclonal antibody generated from peptide in box against the mSLPI peptide sequences.

3. 면역조직화학적 염색

준비된 조직절편을 xylene I, xylene II 및 xylene III로 탈파라핀을 하고 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올을 단계적으로 처리하여 합수를 하였다. 1차 blocking으로 과산화수소수가 포함된 완충액(0.2% H₂O₂ in methanol)에서 20분간 처리 한 후, skim milk(2% skim milk in PBS)를 20분간 처리하여 2차 blocking을 하였다. 2차 blocking 후 세척과정을 거치지 않고 바로 1:250 비율로 2차 blocking 용액인 2% skim milk에 SLPI를 희석하여 실온에서 1시간 40분간 처리를 하였다. 세척 후, 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG 항체(Vector Lab, USA)를 1:500 비율로 PBS에 희석하여 실온에서 30분간 처리하였다. ABC 시약(Vector Lab, USA)은 사용하기 30분전에 PBS로 희석한 후 사용하였고 30분간 반응시켰다. 0.05% DAB(Deaminobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색시킨 후, 헤리스헤마톡실린으로 대조염색 하여 관찰하였다.

4. In-situ hybridization

676bp의 SLPI cDNA를 제한효소로 절단 한 후, 1.5% agarose gel에서 선형화를 확인하였다. 선형화된 DNA 단편을 sodium acetate와 에탄올 용액

에서 -70°C 에 40분 동안 방치하여 침전시켰다. 침전액을 14000rpm으로 20분 동안 원심분리 하여 pellet을 얻었고 이를 DIG RNA labeling kit(Roche molecular biochemical, GER)와 T3, T7 RNA polymerase(Roche molecular biochemical, GER)를 이용하여 sense와 antisense cRNA probe를 제작하였다.

절편들을 면역조직화학염색과 같은 방법으로 탈파라핀과 합수과정을 거친 후 고정액(4% formaldehyde)에서 10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척하고 0.2N HCl을 20분간 처리한 후 PBS로 세척하였다. 0.1M triethanolamine-HCl에서 3분간 반응 후, acetylation 용액(0.25% acetic anhydride in 0.1M Triethanolamine-HCl, pH 8.0)에 10분간 처리하였다. PBS로 세척한 후 탈수 및 탈파라핀 과정을 거쳐 공기 중에 건조시켰다. 절편에 probe를 올리고 50°C 에서 16시간 동안 hybridization 시켰다. Hybridization 후 2X SSC, 0.2X SSC I, 0.2X SSC II로 각각 세척한 다음, 1.5% Blocking Reagent (Roch molecular biochemicals, GER)가 함유된 Dig buffer(100mM Tris-HCl, 150mM NaCl)로 다시 세척하고 anti-Dig antibody를 1:500으로 Dig buffer I에 희석하여 1시간 동안 처리하였다. Dig buffer II(100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 500mM MgCl_2)로 세척하고 nitroblue tetrazolium salt와 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (NBT/BCIP)로 발색하였다. Dig buffer IV(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)로 세척 후, 메틸그린(methyl green)으로 대조염색하여 관찰하였다.

5. 교원질 염색

조직절편을 탈파라핀, 합수, 수세처리를 한 후 Bouin 용액에 옮겨 56°C 에서 1시간동안 후고정을 하였다. 고정한 다음 5-10분간 식히고, 흐르는 물로 절편이 무색으로 변할 때까지 수세를 한 후, Weigert's iron hematoxylin 용액에서 10분간 대조 염색 후 흐르는 물에서 10분간 수세하였다.

Biebrich scarlet acid fuchin 용액으로 15분간 염색한 후 증류수로 수세하

였고, phosphomolybdic-phosphotungstic acid 용액에서 10-15분간 탈색하였다. 탈색한 후 수세하지 않고 직접 aniline blue 용액에 옮겨 10-20분간 염색한 후 증류수로 수세하였다. Acid water에서 3-5분간 처리하고 탈수, 투명, 봉입과정을 거친 후 광학현미경으로 관찰하였다.

6. MDPC-23 세포주 배양 및 분화유도

치유두세포(dental papilla cell) 유래의 MDPC-23 세포주(2×10^5)를 60mm 배양접시에 배양하였다. 배양액으로는 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM; Gibco BRL, USA)에 5% Fetal Bovin Serum(FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제(100-units/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 0.25mg/mL amphotericin B) 및 1X non-essential amino acid solution을 첨가하여 사용하였다. 분화유도를 위해 β -glycerol phosphate 10mM과 ascorbic acid 50mg/mL을 배양액에 첨가하였다. 분화는 90% confluent 상태에서 시작되었고 0일, 4일, 7일, 14일, 21일, 28일을 거쳐서 진행되었다.

7. 역전사중합효소연쇄반응과 실시간역전사중합효소연쇄반응

분화된 MDPC-23세포들에서 Tri reagent(MRC Inc, USA)를 이용하여 각각의 총 RNA를 추출하였다. cDNA 합성을 위해서 AccuPower RT Premix(Bioneer, KOR)를 사용하여 RT를 수행하였고, *Ex Taq* polymerase (Takara, KOR)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

SLPI 프라이머는 전체 SLPI 유전자 서열 중 신호펩타이드 부위와 3'의 비해독 부위를 포함시켜 제작하였다(Fig. 2). mSLPI 특이적 프라이머인 F - 5' - c g g a a t t c c a g a g c t c c c c t g c c t t c - 3' ,

R-5'-gctctagacatagagaaatgaatgcgttt-3'을 제작하여 PCR을 수행하였으며, 반응조건은 94℃ 5분, 94℃ 45초, 63℃ 1분, 72℃ 1분, 72℃ 5분으로 진행하였다. DSPP와 type I collagen(Col-I) 프라이머와 반응조건은 Table 1에 나타내었다.

```

1 gcttctgtcattttcagctctcaggtggttactctgatggcctcatggtcctgcctgaaa
61 cagaaaagtctgccacctacttctgtagcagcaagactcctgttctgtggctaagcttctt
121 gcctgtgcaagagccacagggaggggccaatgcatgccactggggccacgcctcctggt
181 aaagacataaatagtgatcctcgggactggtcatcagagctccctgccttcaccATGAA
2 M K
241 GTCTTCGCGGCTTTTACCTTTCACGGTGCTCCTTGGCTCTGGGGATCCTGGCACCCCTGGAC
22 S C G L L P F T V L L A L G I L A P W t
301 TGTGG AAGGAGGCCAAAATGATGCTATCAAAATCGGAGCCTGCCCTGCTAAAAAGCCTGC
42 V E G G K N D A I K I G A C P A K K P A
361 CCAGTGCCTTAAGCTTGAGAAGCCACATGCCGTA CTGACTGGGAGTGCCCGGGAAGCA
62 Q C L K L E K P Q C R T D W E C P G K Q
421 GAGGTGCTGCCAAGATGCTTGCGGTCCCAAGTGCCTGAATCCTGTTCCCATTCGCAAAACC
82 R C C Q D A C G S K C V N P V P I R K P
481 AGTGTGGAGGAAGCCTGGGAGGTGCGTCAAACTCAGGCAAGATGTATGATGCTTAACCC
102 V W R K P G R C V K T Q A R C M M L N P
541 TCCCAATGTCTGCCAGAGGGACGGGCAGTGTGACGGCAATACAAGTGTGTGAGGGTAT
122 P N V C Q R D G Q C D G K Y K C C E G I
601 ATGTGGAAAGTCTGCCCTGCCCCGATGTGAGcctgatcctgacattggcgccggctct
131 C G K V C L P P M *
661 ggactcgtgctcgggtgctctggaaactacttccctgctcccaggcgtccctgctccgg
721 gttccatgctccggctcctgtatcccaggcttggatcctgtggaccagggttactgt
781 ttaccactaacatctccttttggtcagcattcaccgatcttagggaaatgctggtgg
841 agagcaaataaataaacgcattcatttctctatgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaa

```

Fig. 2. Nucleotide sequences of the mSLPI cDNA. Nucleotide sequences of the mSLPI cDNA are shown, with the amino acid sequence of the predicted translation product listed below the nucleotide sequences. An asterisk indicates the position of the stop codon. Numbers in plainface refer to the nucleotide sequence, and boldface numbers refer to the amino acid sequences.

Table 1. The summary of PCR primer sequences, annealing temperatures and amplification cycles

Gene	5' Forward	3' Reverse	Temp (°C)	Cycles	Size
DSPP	AAT GGG ACT AAG GAA GCT G	AAG AAG CAT CTC CTC GGC	55	30	700bp
Col-I	ATT CGG AGC TCA AGA TGT AA	CAG TCA AGT CCT AGC CAA AC	51	35	191bp
GAPDH	CCA TGG AGA AGG CTG GG	CAA AGA TGT CAT GGA TGA CC	55	35	199bp

Real-time PCR을 수행하기 위해 F-5'-gcccgggaaagcagaggtg-3', R-5'-acattgggagggttaagcatcatacat-3' 프라이머를 제작하였으며 반응조건은 94°C 15분, 95°C 15초, 60°C 15초, 72°C 15초 였다. Exicycler™(Bioneer, KOR)를 이용하여 55°C와 94°C 사이에서 초당 1°C씩 온도를 올리면서 반응 정도를 나타내는 곡선을 분석하였고 연속적인 형광 값을 측정하였다. 반응액 내에 1X SyberGreen(Bioneer, KOR)을 첨가하였으며, 총 반응양은 20μL 였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 조직학적 관찰

1) 모자시기 및 종상기 초기(Cap Stage & Early Bell Stage)

발생 18일과 생후 1일의 조직표본에서는 구강점막(oral mucosa)을 비롯한 특이성을 갖는 세포집단인 외치상피(outer dental epithelium), 치아기관(dental organ), 내치상피(inner dental epithelium) 및 치아유두(dental papilla)가 관찰되었다(Fig. 3a-d). 발생 18일과 생후 1일의 표본에서는 SLPI mRNA의 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 3a and c). 교원질 침착은 구강점막 부분에서 나타났고, 내치상피와 외치상피에서도 연하게 보이나 뚜렷하지는 않았다(Fig. 3b and d).

2) 종상기 후기(Advanced Bell Stage)

생후 4일의 조직표본에서는 내치상피에 의해서 만들어지는 법랑질의 형성이 관찰되었다. SLPI mRNA의 발현은 치수에서는 강하게, 상아모세포와 푯상아질에서는 약하게 관찰되었고(Fig. 3e), 이시기에 푯상아질과 치조골에서 교원질이 염색되었다(Fig. 3f).

3) 치관기(Crown Stage)

치관기에 해당하는 생후 10일과 15일의 조직표본에서는 상아질이 상아모세포에 의해 많이 형성되었으며, 표본 제작시 탈회과정으로 인하여 법랑질의 대부분이 소실되고 하얗게 비어있었다. 생후 10일의 표본에서 SLPI mRNA는 상아모세포 아래층과 Tomes 돌기를 포함하는 상아모세포의 첨단부분에서 발현되었으며(Fig. 4a, b), 이러한 패턴은 면역염색을 통한 단백질반응에서 동일하게 확인되었다(Fig. 4c). 교원질의 경우, 상아모세포의 침

단부위와 인접한 풋상아질과 상아세관에서 강하게 염색되었다(Fig. 4d).

생후 15일에서 SLPI mRNA의 발현은 생후 10일과 동일한 패턴을 나타냈지만 상아모세포에서는 더욱 강하게 발현되었고(Fig. 4e and f), SLPI 단백질은 생후 10일에서와 비슷한 패턴을 보였다(Fig. 4g). 교원질 침착은 생후 10일과 비교했을 때, 풋상아질에서 상아질까지 전체적으로 관찰되었다(Fig. 4h).

4) 치아 맹출기(Functional Stage)

생후 20일의 조직표본에서는 치아의 맹출이 관찰되었으며, SLPI mRNA는 상아질모세포 아래층과 상아모세포에서 발현되었고, 치수에서는 발현이 약하였으며(Fig. 5a and c), 음성대조군에서는 반응하지 않았다(Fig. 5b). 교원질 침착은 상아질과 시멘트질과 접하는 치주인대에서 관찰되었다(Fig. 5d and e).

2. MDPC-23 세포분화 과정 중 SLPI, DSPP 및 type I collagen mRNA의 발현

MDPC-23 세포에서 4일, 7일, 21일 및 28일 동안 분화를 진행시켜 SLPI mRNA의 발현을 RT-PCR과 real time PCR로 확인하였고, DSPP와 type I collagen mRNA 발현은 RT-PCR을 통해서 관찰하였다(Fig. 6).

RT-PCR 결과, SLPI는 분화 7일째부터 약하게 발현하였고, 21일에 가장 강하게 발현하였으며, 28일째에서는 관찰되지 않았다. Real-time PCR을 이용한 실험에서도 이와 유사한 결과를 얻었다(Fig. 6a). DSPP는 분화 4일째부터 발현이 점진적으로 증가하여 분화 28일째까지 관찰되었다. Type I collagen 역시 분화 4일째부터 발현되기 시작하였으며, 분화 28일째에서는 약하게 발현되었다(Fig. 6b).

IV. 총괄 및 고안

치아발생과정 중 상피-간엽조직(epithelial-mesenchyme)의 상호작용 결과 상피세포의 세포분화가 일어남으로서 법랑모세포가 형성되고 외배엽성 간엽조직 세포로부터 상아모세포가 형성된다(Maas & Bei, 1997; Theslef & Sharpe, 1997). 이들 중 분화된 상아모세포는 상아질의 기질을 만들어낸다(Butler, 1995). 상아질 형성과정(dentinogenesis) 동안 치유두세포는 입방형에서 원주형의 모양으로 분화되며, 섬유 교원질성(fibrous collagenous) 기질을 분비하여 외투상아질(mantle dentin)을 형성한다. 이 과정은 몇 가지 세포외기질 단백질들의 상호조화된 발현을 포함하고 있다(Linde & Goldberg, 1993). 상아모세포는 상아질에서 발견되는 대부분의 세포외기질 성분을 생산하며 상아질의 광화에 관여한다. 상아질에서 관찰되는 단백질은 교원질성 외에 비교원질성 단백질들로 광화(mineralized)된 조직에서 주로 관찰되는 분자들과 조직에 광범위하게 분포하는 분자들로 나눌 수 있다. 상아질 세포외기질의 90%를 차지하는 교원질의 경우 I(98%)형과 III(2%)형이 대부분을 차지하고, 세포외기질의 10%정도를 차지하는 비교원질성 단백질의 경우는 dentin sialophosphoprotein(DSPP), bone sialoprotein(BSP), osteopontin(OPN), dentin matrix protein-1(DMP-1), metalloproteinases (MMP-1,-2,-9) 및 amelogenin(Aml) 등이 있다(Goldberg & Smith, 2004).

교원질이 III형에서 I형으로 전환되는 과정은 이전 교원질의 용해와 새로운 교원질의 합성이 연관된 상호작용에 의해서 조절되는데, 이들의 중심에 있는 분자가 metalloproteinase와 collagenase으로 알려져 있다(Kirsner & Eaglstein, 1993). 기질붕괴효소인 matrix-degrading metalloproteinase (MMP)는 전구효소(pro-enzyme)로 활성화가 되어야하며, 이 분자는 기질 붕괴의 생리학적 중개자로서 작용한다. Prototype MMP는 interstitial

collagenase이지만 zymogen으로서 분비되는 효소는 적어도 10개 정도가 존재한다. MMP는 크게 3가지로 나뉘는데, collagenase(MMP-1, -8, -13, -18)인 MMP-1은 I, II, III, VII, X형 아교질에 작용하고, gelatinase는 A형(MMP-2)과 B형(MMP-9)으로 나뉘며 A형은 IV형 교원질과 엘라스틴, 젤라틴을 붕괴하며, B형은 대식세포, 중성구 및 각질세포 등에서 분비되는 것으로 알려져 있다. Stromelysins 1(MMP-3)과 2(MMP-10)는 프로테오글리칸(proteoglycan), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(lamin), 젤라틴(gelatin), III, IV, IX형 교원질에 작용하고, stromelysin 계열인 matrilysin(MMP-7)은 주로 피브로넥틴, 젤라틴, 엘라스틴(ealstin)의 붕괴에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근에 알려진 MMP-20은 아멜로제닌(amelogenin)의 붕괴에 관련하기 때문에 에나멜라이신(enamelysin)으로 불리고 있다. 이들 MMP들은 성장인자들 뿐만 아니라 세포외기질의 자극에 의해서 활성화된다(Tjaderhane *et al.*, 1998).

SLPI는 chymotrypsin, trypsin, neutrophil elastase 및 cathepsin G 등의 억제능력을 가지고 있으며, SLPI 잔기의 단백질분해효소 억제부분은 카복실기 말단에 위치한 72번째 루신으로 알려져 있다. SLPI의 항단백분해효소기능은 퇴화 또는 염증부위의 분비액 조성을 보호하는데 중요한 역할을 한다(Eisenberg *et al.*, 1990). 실제로 SLPI는 중성구 엘라스타제에 의한 사람호흡기 상피표면 손상에 대한 방어인자로서 보고되었으며, 타액에 존재함으로써 많은 세균에 노출되어 있는 구강의 염증조절과 붕괴된 효소의 합성을 유도하는 중요한 역할을 한다(Vogelmeier *et al.*, 1991). 비록 SLPI의 기능이 단백질분해효소의 직접적인 억제에 의한 염증조절에 관여한다고 하지만, 발표된 다른 보고에 의하면 단핵구에 의해 생산되는 MMP-1과 -9의 분비에 관여하는 신호전달과정을 막음으로서 결합조직의 붕괴를 억제하는 기능을 나타낸다고 하였다(Zhang *et al.*, 1997). 또한, SLPI 유전자가 결손된 생쥐의 구강점막 상처치유과정에서 MMP-2와 -9의 발현이 증가한다고

하였다(Angelov *et al.*, 2004). SLPI 외에 단백질분해효소억제제로 알려진 것 중, tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1)과 -2(TIMP-2)는 단백질분해효소를 직접적으로 억제하기보다는 세포반응을 조절하는 기전을 통하여 억제하는 것으로 알려져 있다. 상아모세포에서는 MMP-1, -2, -3, -9 등이 발현되고, 아직 명명되지 않은 collagenase와 MMP-2가 광화된 사람의 상아기질에서 동정되었으며(Fukae *et al.*, 1991; Martin-De Las Heras *et al.*, 2000), MMP-2, -8, -9 등이 치아우식 부위에서 확인되었다(Tjaderhane *et al.*, 1998; Tjaderhane *et al.*, 2000). 따라서 MMP는 상아기질형성과 치아우식 진행을 조절할 것으로 생각된다.

SLPI가 치아에서 발현된다는 보고는 현재까지 없었으며, 본 연구를 통하여 처음으로 발생 중에 있는 생쥐 치아의 상아모세포에서 SLPI mRNA와 단백질의 발현이 확인되었다. 본 연구의 결과에서 상아질 형성 과정 중 교원질의 합성과 더불어 SLPI 발현의 증가는 상아질의 많은 부분을 차지하는 교원질의 붕괴를 막기 위해서와 간접적인 세포간의 조절을 통하여 MMP를 억제하기 위해서라고 생각되지만, 상아모세포에서 SLPI와 MMP의 발현과 조절관계에 대한 연구는 앞으로 더 진행되어야 할 것으로 보인다.

비교원질성 단백질은 광화된 조직에서 주로 발견되는 분자들과 광범위하게 발견되는 두 가지 종류로 구분된다. 오랫동안 dentin phosphoprotein (DPP)과 dentin sialoprotein(DSP)이 상아질에만 존재하는 것으로 생각되었으나(MacDougall *et al.*, 1997; Ritchie *et al.*, 2002), 현재에는 뼈세포도 DSP(DPP도 아마 합성할 것임)를 합성하는 것으로 보고되었으며, 상아질과 비교하면 그 비율은 1:400정도 이다(Qin *et al.*, 2002). DSP와 DPP 단백질은 단일 DSPP 유전자의 전사(transcription)에 의해서 만들어진다. DSPP는 상아모세포에 대한 특이 유전자로 알려져 있었으나(D'Souza *et al.*, 1997) 전구법랑모세포(preameloblast)에서도 잠시 발현되며, 최근에는 뼈세포에서도 DSPP가 발현된다는 보고가 있어 상아모세포의 특이 유전자가 아닌 것

으로 생각된다(Qin *et al.*, 2002). DMP-1의 경우도 뼈와 상아질에서 모두 발현된다(George *et al.*, 1993). 이러한 단백질들은 모두 상아질형성과정에서 결정성장에 관여함으로서 광화에 직접적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한, 최근에 DSPP, DSP, DPP, DMP-1, BSP 및 OPN 등은 광화에 관련된 기능 외에 세포독성에 대한 방어 신호기능을 하는 것으로 보고되어 SIBLINGs(Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins)군으로 따로 분류되었다(Fisher & Fedarko, 2003). BSP와 OPN은 뼈에서 주로 발견되지만 상아모세포와 상아질에서도 존재한다.

상아모세포 세포주인 MDPC-23 세포를 분화시켜 DSPP의 발현으로 광화를 확인하였으며, 분화 4일째부터 21까지 I형 교원질의 발현과 더불어 SLPI 역시 7일째부터 21일째까지 발현이 증가하였다. 이러한 결과로 보아 SLPI는 광화가 일어나는 과정동안 상아모세포로부터 분비된 교원질의 붕괴를 막는 것으로 생각된다. 또한, SLPI의 발현 양상이 DSPP와 유사한 것으로 미루어 RNAi 방법을 이용하여 상아모세포에서 발현되는 인산화된 단백질인 DSPP과 OPN 그리고 비인산화 단백질인 osteocalcin(OC), osteonectin(ON)의 발현을 규명하는 일도 진행되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구결과를 종합하면, 치아발생과정 중 SLPI는 MMP를 조절하여 상아질 형성 단백질 중 가장 많은 비율을 차지하는 교원질의 붕괴를 막기 위해 증가되는 것으로 생각되며, DSPP로 확인된 광화과정동안 상아모세포로부터 분비된 교원질의 붕괴를 막는 것으로 사료된다.

V. 결 론

분비백혈구단백분해효소억제제(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)는 엘라스타제 cathepsin G와 다른 단백질분해효소를 억제함으로써 자가붕괴(self destruction)로 부터 조직을 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 치아발생과정은 치아유두와 법랑질기관의 형태학적, 생화학적 변화를 동반함으로써 많은 기질 단백질들의 생성과 분해가 일어나는 과정으로 SLPI는 단백질분해 효소들의 조절단백질로 발현 가능성이 있을 것으로 생각된다. 그러나 현재까지 치아에서 SLPI의 발현과 역할에 대한 보고는 거의 없다. 따라서, 본 연구는 치아발생과정 중 상아모세포에 의한 상아질 형성과 광화에서 SLPI의 역할을 알아보기 위해 치아발생단계별로 SLPI의 발현정도와 발현위치를 관찰하였다.

조직 내에서 mRNA와 단백질의 분포를 확인하기 위해서 mRNA *in-situ* hybridization과 면역조직염색을 시행한 결과, 상아모세포가 원주형의 세포로 분화하면서 SLPI의 발현이 증가하였다. 교원질의 합성을 관찰하기 위해 교원질염색염색을 한 결과 SLPI의 발현과 동일한 시점인 종시기와 치관기에서 염색되었다. 광화를 위한 분화실험으로 치유두세포인 MDPC-23 세포주에서 SLPI와 I형 교원질의 발현 역시 생쥐조직에서의 결과와 동일하였다.

따라서, 본 연구결과로 SLPI가 상아모세포에서 발현된다는 것을 처음 증명하였으며, 광화과정동안 교원질의 붕괴를 막기 위해 MMP를 조절함으로써 SLPI가 상아모세포에서 교원질의 발현과 더불어 증가되어 발현되는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, Brewer MT, Thompson RC, Crystal RG (1991). Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J Clin Invest* 87:2207 - 2215.
- Angelov N, Moutsopoulos N, Jeong MJ, Nares S, Aschcroft G, Wahl SM (2004). Aberrant mucosal wound repair in the absence of secretory leukocyte protease inhibitor. *Thromb Haemost* 92:288-297.
- Arana-Chavez VE, Massa LF (2004). Odontoblast: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1367-1373.
- Begue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H (1994). Comparative analysis of TGF- β s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 38:405-420.
- Butler WT (1995). Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 33:56-65.
- Cobourne MT (1999). The genetic control of early odontogenesis. *Br J Orthod* 26(1):21-28.
- D'Souza R, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Oshima T, Julkarni A, MacDougall M (1997). Gene expression of murine dentin matrix protein(Dmp1) and dentin sialoprotein(DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12:2040-2049.
- Eisenberg SP, Hale KK, Heimdeal P, Thompson RC (1990) Location of

- the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Biol Chem* 265:7976-7981.
- Fisher LW, Fedarko NS (2003). Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 44:33-40.
- Fritz H (1988). Human mucus proteinase inhibitor (human MPI). Human seminal inhibitor I (HUSI-I), antileukoprotease (ALP), secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI). *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369:79 - 82.
- Fukae M, Kaneko I, Tanabe T, Shimizu M (1991). Metalloproteinases in the mineralized compartments of porcine dentine as detected by substrate-gel electrophoresis. *Arch Oral Biol* 36:567-573.
- George A, Sabsay B, Simonian PAL, Veis A (1993). Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. *J Biol Chem* 268:12642-12630.
- Goldberg M, Smith AJ (2004). Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 15(1):13-27.
- Jin F, Carl N, Danuta R, Aihao D (1997). Secretory leukocyte protease inhibitor: A macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 48:417-426.
- Kirsner RS, Eaglstein WH (1993). The wound healing process. *Dermatol Clin* 11:629-640.
- Laurie RG, Audrey LA, Diane CS (2002). Construction, non-denaturing affinity purification, and characterization of baculovirally expressed human secretory leukocyte protease inhibitor. *Prot Exp & Purif*

- 26:179-186.
- Lesot H (2000). Odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *J Dent Res* 79(9):1640-1644.
- Linde A, Goldberg M (1993). Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:679-728.
- Maas R, Bei M (1997). The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med* 8:4-39.
- MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT (1997). Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleaved products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem* 272:835-842.
- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM (2000). The matrix metalloproteinases gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 45:757-765.
- McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM (1995). Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity *in vitro*. *J Clin Invest* 96:456-464.
- Nick D, Gholamreza HG, Jing Z, Lea B, Patrick de B, Hilde R (2003). Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 100:5778-5782.
- Ohlsson K, Bergenfeldt M, Bjork P (1988). Functional studies of human secretory leukocyte protease inhibitor. *Adv Exp Med Biol* 240:123 - 131.
- Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H (2002).

- The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 81:392-394.
- Ritchie HH, Kasugai JLS, Moller P (2002). A mineralizing rat dental pulp cell subline expressing collagen type I and dentin sialoprotein-phosphoporyn transcripts. *In Vitro Cell Dev Biol* 38:25-29.
- Theslef I, Sharpe P (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 67:111-123.
- Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V-J, Larmas M, Salo T (1998). The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 77:1622-1629.
- Tjaderhane L, Palosaari H, Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Bartlett JD (2000). Caries induced the expression of MMP-20 mRNA in human teeth (abstract). *J Dent Res (Spec Iss)* 78:334.
- Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T (2002). Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res* 15:55-58.
- Vogelmeier C, Hubbard RC, Fells GA, Schnebli HP, Thompson RC, Fritz H, Crystal RG (1991). Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukocyte protease inhibitor. *J Clin Invest* 87:482-488.
- Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM (1997). Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocytes prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase. *J Clin Invest* 99(5):894-900.

사진부도 설명

Fig. 3. Cap (E18) (b), early bell (E18) (a), bell (PN1)(c, d), and advanced bell stage (PN4)(e, f). Negative results shows in *in situ* images at early bell stage (E18) and bell stage (PN1)(a, c). Masson's staining shows slightly positive for collagen oral mucosa (om) and outer dental epithelium (ode)(b, d). Positive reaction of the *in situ* and immunohistochemistry (insert) in pulp cells (pc) and odontoblast layer (ol) was observed at the advanced bell stage (PN4) (e). Masson's staining shows positive reaction in predentin (pd) and alveolar bone (ab) (f). do, dental organ; ide, inner dental epithelium; dp, dental papilla; al, ameloblast layer; ab, alveolar bone. Scale bars of a, c, and d indicate 100 μ m. Scale bars of b, e, and f are 20 μ m. 25

Fig. 4. Crown Stage (PN10) (a-d) and (P15) (e-f). Dentinal tubules (arrows) are shown positive *in situ* reaction and expression of SLPI is more strong than postnatal day 4 in subodontoblast layer (sl) (a, b). At PN10 (c) and PN15 (g), immunoreaction of SLPI was shown in odontoblast layer but not in subodontoblast and pulp. At PN15, strong expression of the SLPI is shown in odontoblast layer and dentinal tubules (e, f) compared to PN10. Masson's staining of PN15 (h) shows strong reaction more than PN10 in predentin (pd) (d). al, ameloblast layer; p, papilla. Circle of a is b. Arrows indicate dentinal tubules. All scale bars indicate 20 μ m except a and e (100 μ m). 26

Fig. 5. Functional Stage (PN20). After eruption of the tooth, expression of the SLPI is restricted to subodontoblast layer in pulp and periodontal ligament also strong (p) (a, c). Negative control for *in situ* is shown in b. Masson's staining shows strong reaction

in dentin and alveolar bone (d, e). Pdl, periodontal ligament; p, pulp; ab, alveolar bone. Scale bars of a, b, and d are 100µm. Scale bars of c and e indicate 50µm.

..... 27

Fig. 6. mRNA expression of SLPI and DSPP, Col-I. RT-PCR and Real time PCR (a) results are identical pattern of the SLPI expression during the differentiation of MDPC23 cells. mRNA of SLPI shows strong expression at day 21. 28

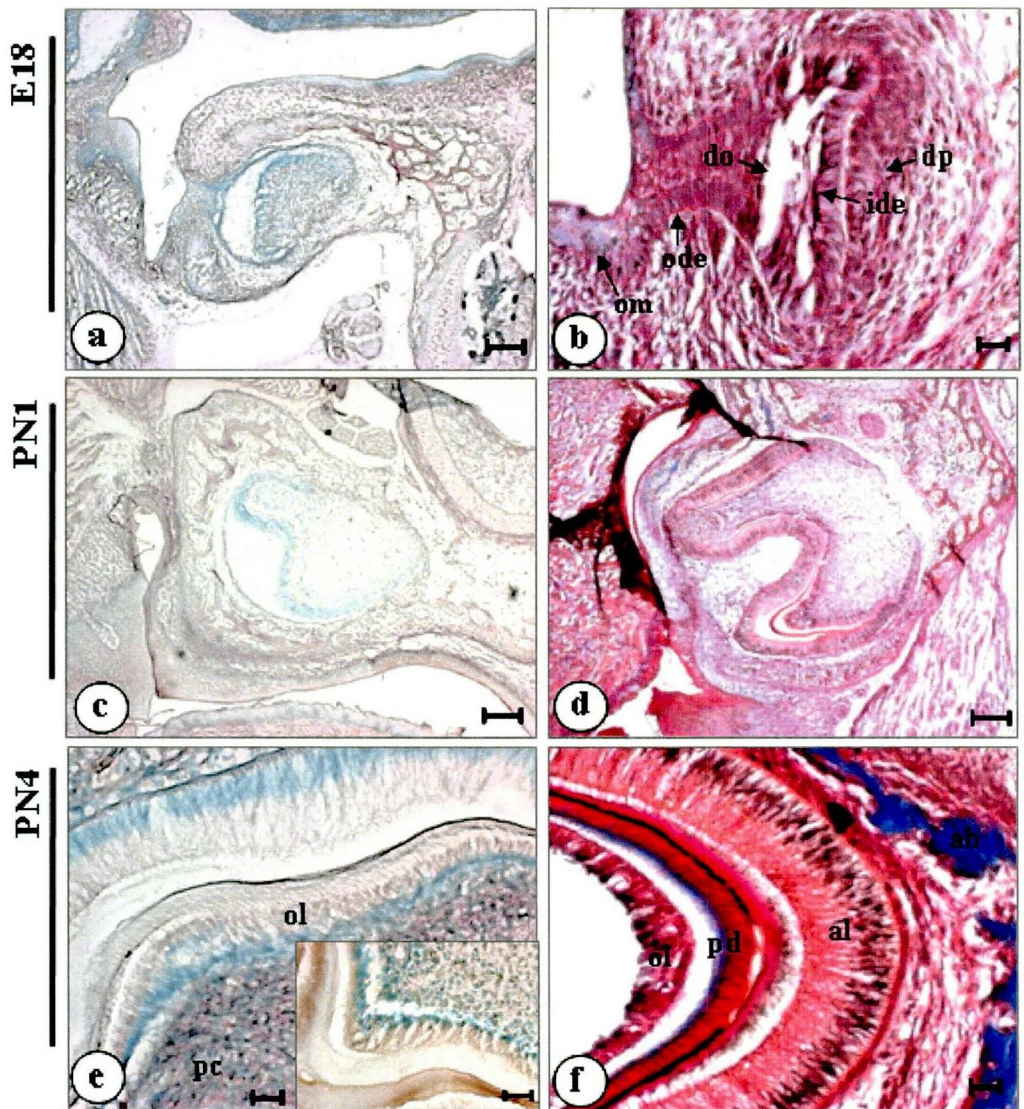


Figure 3. Image of in-situ and immunostaining of early bell, bell, and advanced bell stage.

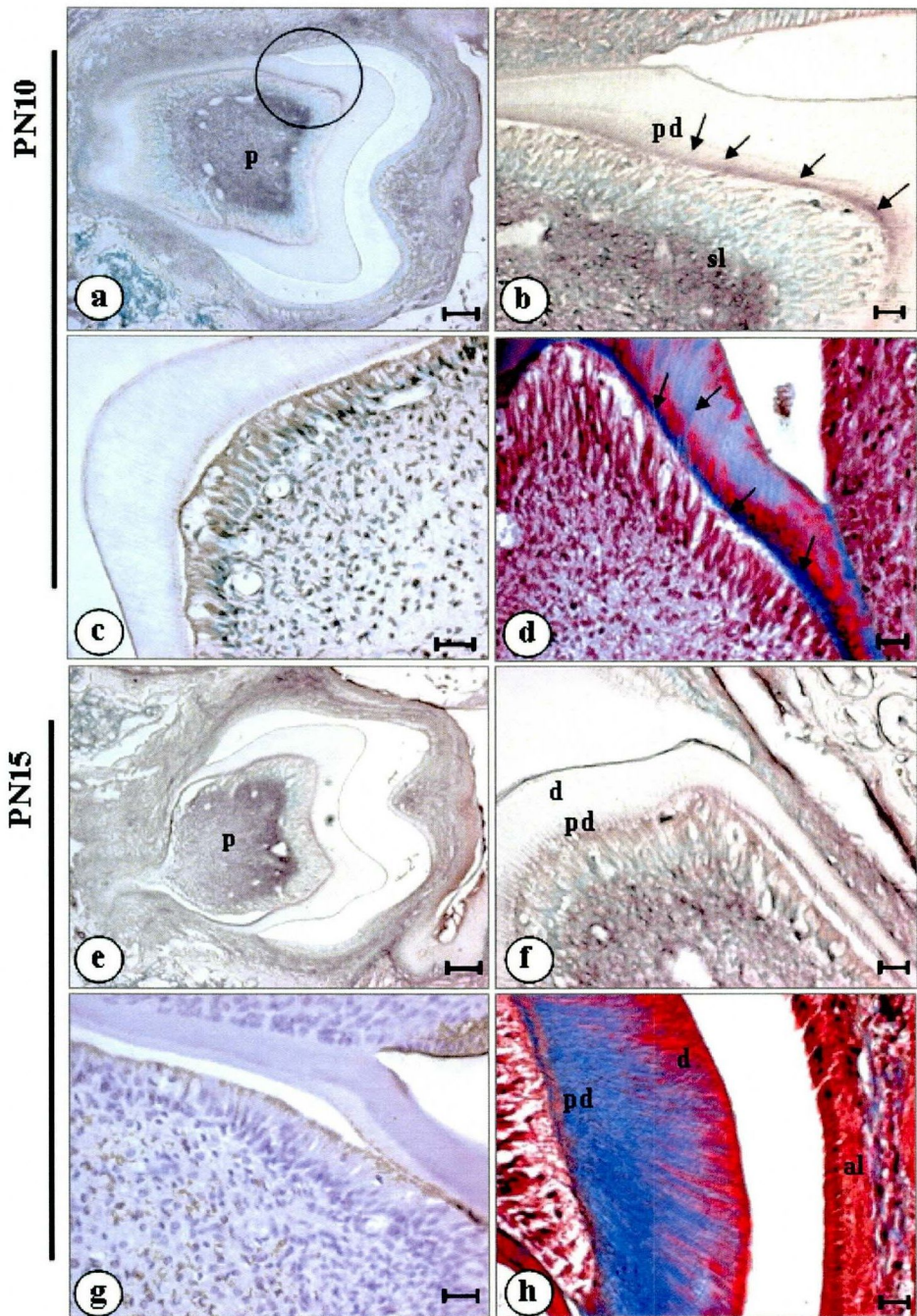


Figure 4. Image of crown stage.

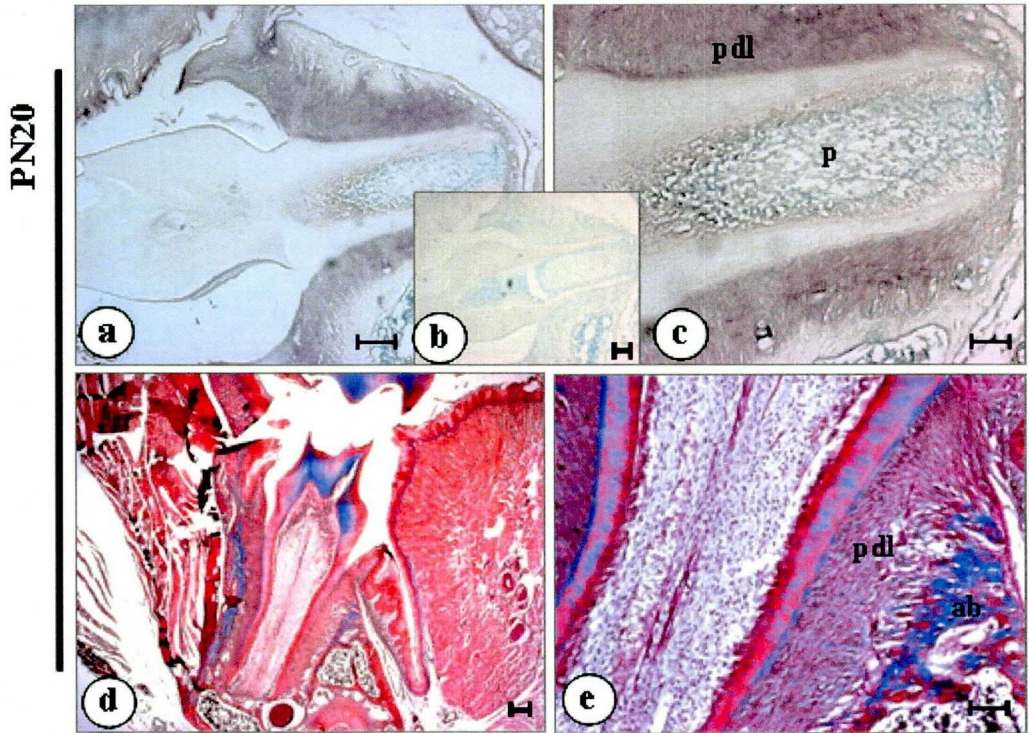


Figure 5. Image of functional stage.

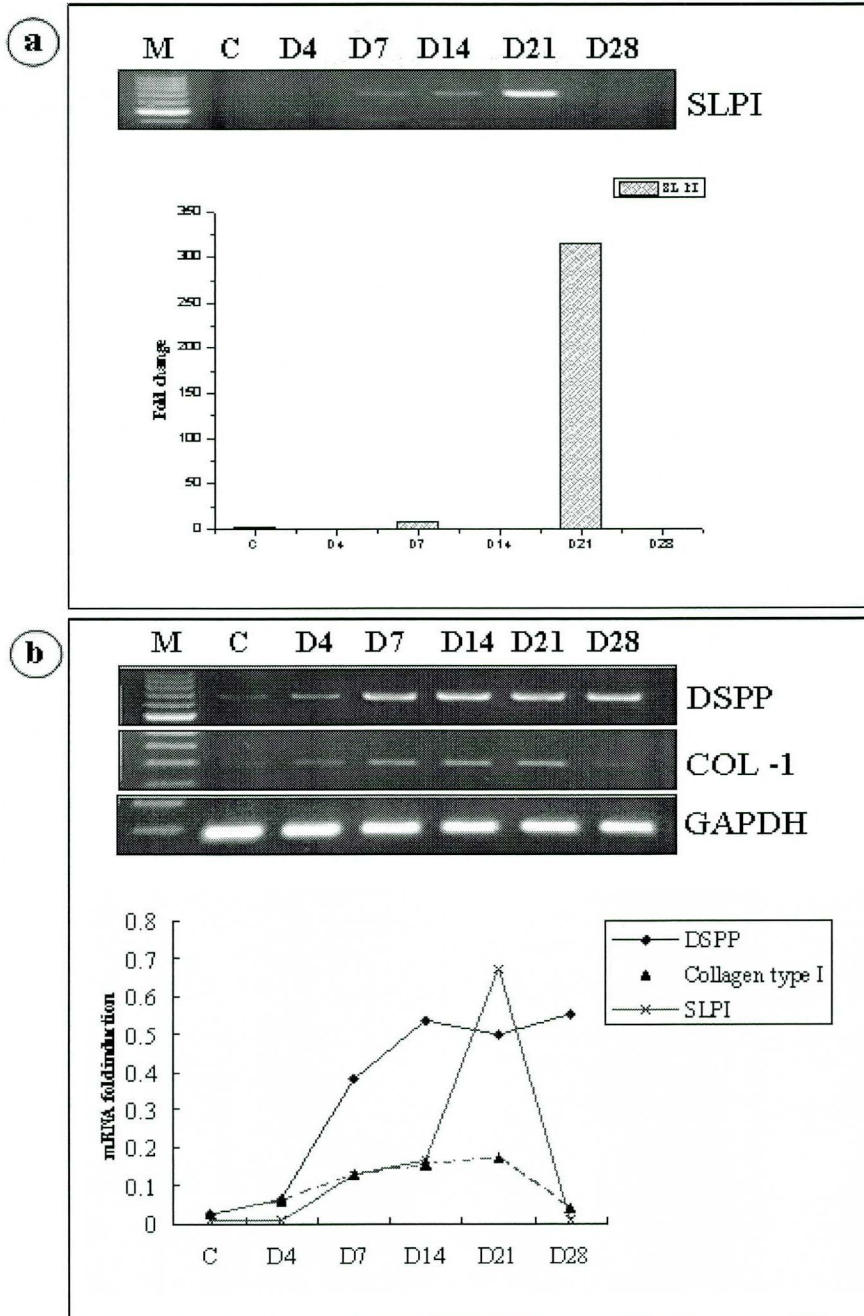


Figure 6. mRNA expression of SLPI, DSPP, and type I collagen.

저작물 이용 허락서

학 과	치의공학과	학 번	20057603	과 정	박 사
성 명	한글 : 정 제 오 한문 : 정 제 오 영문 : Jeong, Je-O				
주 소	서울시 노원구 중계 1동 건영 3차 Apt. 305-402				
연락처	E-MAIL :				
논문제목	한글 : 생쥐 상아모세포 분화과정에서 분비백혈구단백분 해효소억제제(SLPI)의 발현				
	영문 : Expression of the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) during mouse 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() 반대()

2006 년 12 월 일

저작자: 정 제 오  (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하