

2007년 8월  
박사학위논문

치수와 치은 섬유모세포에서  
Mineral Trioxide Aggregate  
(MTA)가 세포증식, Alkaline  
phosphatase, Osteonectin 발현에  
미치는 영향

조선대학교 대학원

치 의 학 과

노 봉 환



치수와 치은 섬유모세포에서  
Mineral Trioxide Aggregate  
(MTA)가 세포증식, Alkaline  
phosphatase, Osteonectin 발현에  
미치는 영향

Effects of Mineral Trioxide Aggregate (MTA) on  
Cell Proliferation, Alkaline phosphatase and  
Osteonectin Expression of Dental Pulp and Gingival  
Fibroblast Cells

2007년 8월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

노 봉 환

치수와 치은 섬유모세포에서  
Mineral Trioxide Aggregate  
(MTA)가 세포증식, Alkaline  
phosphatase, Osteonectin 발현에  
미치는 영향

지도교수 황 호 길

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2007년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

노 봉 환

## 노봉환의 박사학위 논문을 인준함

위원장	연세대학교	교수	이 승 종	인
위 원	조선대학교	교수	이 상 호	인
위 원	조선대학교	교수	윤 정 훈	인
위 원	조선대학교	교수	박 주 철	인
위 원	조선대학교	교수	황 호 길	인

2007년 6월 일

조선대학교 대학원

# 목 차

## ABSTRACT

I. 서 론 .....	1
II. 연구재료 및 방법 .....	3
1. MTA 시편의 준비 .....	3
2. 치수 및 치은 섬유모세포의 배양 .....	4
3. Cell Viability Assay (MTT assay) .....	4
4. Von Kossa staining .....	5
5. Alkaline phosphatase activity .....	5
6. 총 RNA 추출과 역전사 중합효소 연쇄반응 .....	5
III. 연구결과 .....	7
1. Cell Viability Assay (MTT assay) .....	7
2. Von Kossa staining .....	7
3. Alkaline phosphatase activity .....	8
4. RT-PCR analysis .....	8
IV. 고 찰 .....	12
V. 결론 .....	15
참고문헌 .....	16

# 표 목 차

Table 1. Primers used for RT-PCR .....	6
--	---

## 도 목 차

Fig. 1. Photograph and schematic drawing of transwell insert used in the six-well plates to prevent the direct physical contact between the cells and the MTA. ....	3
Fig. 2. Survival and proliferation of dental pulp cells and gingival fibroblasts on MTA. ....	7
Fig. 3. Alkaline phosphatase activity in dental pulp cells and gingival fibroblasts on MTA. ....	8
Fig. 4. Transcript alteration in dental pulp cells and gingival fibroblasts by MTA. ....	9
Fig. 5. Intensities of bands mRNA of dental pulp cells and gingival fibroblasts shown in Fig 4 were normalized with respect to those for GAPDH. ....	10



# ABSTRACT

## Effects of Mineral Trioxide Aggregate (MTA) on Cell Proliferation, Alkaline phosphatase and Osteonectin Expression of Dental Pulp and Gingival Fibroblast Cells

No, Bong-Hwan

Advisor : Prof. Hwang, Ho-Keel

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Mineral trioxide aggregate (MTA) is used clinically for pulp capping, retrograde filling, repair of root perforation, where it stimulates dentin, cementum formation and promotes gingival healing. In this study, the author investigated the in vitro effects of MTA on various gene expression regarding dentinogenesis and cell viability assay in cultured primary human dental pulp and gingival fibroblast cells. The author also examined the effects of this material on cellular alkaline phosphatase activity as a potential indicator of mineralization. For gene expression on MTA, reverse transcriptase polymerase chain reaction was performed using primer sets for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, alkaline phosphatase (ALP), osteonectin (SPARC), and dentin sialophosphoprotein (DSPP) after 2 and 4 days. Cell viability assay showed that the proportion of MTA treated pulp cells exposed for 5 days to MTA was higher than the control cells. Of the genes

investigated in this study, ALP and osteonectin (SPARC) were increased than control. In contrast, MTA did not induce dentinogenic or osteogenic activity. These findings suggest that this culture system may be useful in the future as a model for studying the mechanisms underlying dentin or bone regeneration after the treatment of MTA. Exposure to MTA material did not induce cytotoxic response in the dental pulp and gingival fibroblast cells. In addition, MTA could influence the behaviour of human pulp cells by increasing the ALP activity and SPARC synthesis.

## I. 서 론

상아질은 치아우식증, 외상, 화학적 손상 등에 대하여 자극의 정도에 따라 반응상아질(reactionary dentin)을 형성하여 상아질과 치수를 건전하게 유지하고 치아를 보호한다(1). 반응상아질은 미약한 외부손상에 의해 상아모세포가 손상되지 않아 발생과정에서 생리적으로 형성되는 상아질과 동일한 특성을 나타낸다. 그러나 수복상아질(reparative dentin)은 기존의 상아모세포가 손상되어 치수세포에서 새로운 상아모양세포 (odontoblast-like cell)가 분화하여 만들어 내기 때문에 생리적인 상아질의 특성과는 다른 골상아질(osteodentin)로 구성된다. 수복상아질이 형성되는 이유는 치수에는 상아질을 만드는 상아모세포로 증식하고 분화할 수 있는 줄기세포가 포함되어 있기 때문이다. 치아우식증, 교모증, 마모증, 와동형성과 같은 외부의 다양한 stress에 의해 손상된 상아모세포는 치수 줄기세포로부터 유래된 새로운 상아모양세포로 대체된다. 이런 일련의 세포변동 과정은 줄기세포의 recruitment, 세포분화와 그 다음으로 세포의 분비능력의 활성화와 관련된 유전자의 전사활성의 증가에 의해 기질 분비에 의해 수복상아질이 형성된다 (1-3). 일반적으로 충치나 치과치료와 같이 생리적 자극이나 손상이 일어나면 치수 줄기세포는 주위의 상아기질(dentin matrix)에서 분비되는 morphogen에 의해 상아모양세포로 분화하고 증식한다. 이때 관여하는 signaling molecule은 정상 치아발생에서 상피-간엽 상호작용(epithelial-mesenchymal interaction)에 의해 상아모세포가 유도되는 것과 같은 양상으로 BMP를 포함하는 TGF family, WNT, FGF, Hedhog, IGF와 같은 성장인자의 신호에 의해 매개된다. 따라서 상아질은 단순히 치수를 보호하는 치아 경조직 이라기 보다는 tissue conditioner로 처리하면 치수를 재생시키거나 수복하는데 필요한 bio-active molecule이 저장된 저장소로서의 역할이 더 중요하다고 할 수 있다 (4,5).

이러한 손상에 대한 치수조직의 수복 및 재생은 상아질-치수 복합체의 특이 세포 반응의 자극이 단순한 기계적인 접근보다는 생물학적인 접근 방식에 대한

이해도를 증가시켜, 생활성 물질의 조절과 적용에 의한 새로운 전략이 가능하게 되었다(2,3,5).

전통적으로 치수 수복 및 재생재료의 "gold standard"로 calcium hydroxide를 임상적으로 널리 이용하여 왔다(6). Calcium hydroxide의 상아질 다리 형성을 증진시키는 효과는 칼슘 이온의 유리에 의한 삼차 상아질 형성을 자극하는 것 이외에 높은 pH에 의한 항균효과가 복합적으로 작용하는 것으로 믿고 있다. 최근 mineral trioxide aggregate (MTA)가 calcium hydroxide를 대체할 수 있는 치수 재생재료로 제시되고 있다. MTA는 tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalcium aluminate, tetracalcium aluminoferrite, calcium sulfate와 bismuth oxide로 구성된 시멘트이다. 강알칼리성으로 생체친화적인 측면이나 조직학적 평가에서 수산화칼슘과 유사한 작용을 하며 *in vitro* 및 *in vivo* 연구결과 MTA는 유리된 칼슘 이온이 조직의 인산염과 반응하여 hydroxyapatite를 형성하는 물리 화학 반응의 결과로 calcium hydroxide에 비해 상아질 형성에 더 효과적이다. 치질과의 접착과 봉합 능력이 우수하다고 보고된 바 있다 (7,8). 초기와 경화기에 MTA의 수소이온 농도 지수가 높기 때문에, 이는 인접 세포 용해와 중등도의 단백질 변성을 야기한다. 그러나 MTA 경화 후에는 세포 형태에 영향을 미치지 않으며 세포 성장에 제한된 영향을 미침으로써 만족할만한 생체친화성을 보인다. 실험적으로 MTA를 쥐의 피하 결합조직에 이식하였을 때, calcium hydroxide와 비슷한 효과를 보이며 (9), MTA를 치근단 충전 재료로 이용한 실험에서도, 이와 직접 접촉한 부위에 섬유성 결합조직과 얇은 경조직층이 형성되며(10,11), 아울러 백악질과 치주인대 섬유의 형성도 표면에서 관찰되었다 (12,13). 이와같이, MTA는 골모세포의 생물학적 반응을 촉진시키고, 세포부착을 위한 생체친화적 표면도 제공한다 (14-16). 이러한 이유로 MTA는 임상적으로 치수복조, 근침형성술 (apexification)시 calcium hydroxide와 유사하거나 더 우수한 결과를 보여, 치근외흡수, 치근이개부 및 치근 천공을 수복하는데 성공적으로 사용되어왔다 (3, 6, 13, 17, 18, 19).

임상적으로 MTA가 치수 및 치주조직 재생을 유도하는 것으로 보이기는 하지만, MTA가 치수 및 치은 섬유모세포 기능에 영향을 미치는 기전은 알려져 있지 않다. 특히, MTA가 세포학적으로 치수 및 치은 섬유모세포의 생존이나 초기에 석회화 관련 유전자 발현에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 이 연구에서는 사람의 치수 및 치은 섬유모세포의 초기 생존에 어떠한 영향을 미치며 초기에 발현되는 석회화 관련 유전자 변화에 미치는 MTA의 효과를 비교 평가하기 위해 수행하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. MTA 시편의 준비

이 연구에서는 white ProRoot MTA (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland)를 이용하였다. MTA는 제조자의 지시에 따라 혼합하였고, 조작은 무균상태의 laminar flow hood에서 수행하였다. 혼합한 MTA pellet은 24시간동안 37<sup>0</sup>C의 습한 CO<sub>2</sub> incubator에 두어 최종경화를 유도 하였다. 경화된 pellet은 EO 가스를 사용하여 멸균소독하였다. 각각의 경화된 pellet의 크기는 대략 1 cm x 1 cm이었다.

경화된 pellet은 세포와 직접접촉을 방지하기 위해 transwell insert (Corning, New York, NY, USA)에 넣어 실험하였다. Transwell insert는 침투성 막(pore size 0.4 um)이 있어, 이는 세포와 시편 사이에 직접적인 물리적 상호작용은 막는 반면 시편으로부터 용해성 화합물이 세포로 도달할 수 있도록 하였다 (Fig. 1). 대조군 세포는 transwell insert 만 있고 MTA 표본은 없는 6-well plate에서 배양하였다.

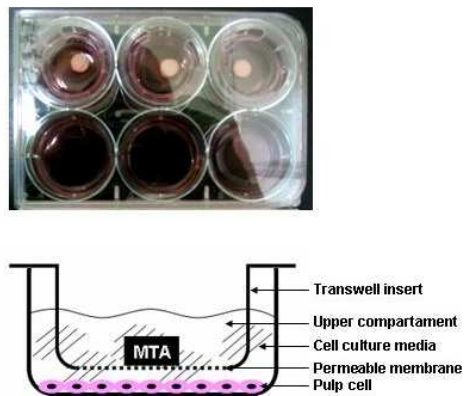


Fig. 1. Photograph and schematic drawing of transwell insert used in the six-well plates to prevent the direct physical contact between the cells and the MTA.

## 2. 치수 및 치은 섬유모세포의 배양

치수세포의 배양을 위해 이 연구에서 사용된 치아는 미성숙 제3대구치로 16세 환자의 정상적인 치료과정 중에 발치한 치아로, 환자의 동의하에 사용되었다. 발치 후 즉시 치아를 70%(v/v) 알코올로 물기를 닦고 멸균된 phosphate-buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4)로 수세하였다. 이후 치아는 laminar flow tissue culture hood의 멸균상태에서 실험을 수행하였다. 치아의 치근단 부분은 멸균된 외과용 메스로 제거하고 치수는 겹자로 제거하였다. 제거한 치수는 외과용 메스로 잘게 썰어 PBS로 수세하였다. 치은 섬유모세포의 배양은 교정목적으로 소구치 발치를 시행한 환자에서 인접한 건전한 치은조직을 얻어 실험하였다. 제거된 치은조직에서 상피는 1% collagenase를 처리하여 상피와 점막하 조직을 분리하여 사용하였다. 세포배양은 100mm 직경의 배양 접시 (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ)에 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 ug/ml의 streptomycin, 그리고 100 U/ml의 penicillin을 포함한 modified Eagle's medium (MEM) (GIBCO)에서 배양하였다. 배양은 37°C의 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기의 습한 공기에서 유지하였다. 매일 배양 배지를 교환하였고, 부착된 배양세포들은 trypsinization (0.2% trypsin과 0.02% EDTA)하여 2차 배양하였다.

## 3. Cell Viability Assay (MTT Assay)

치수 및 치은 섬유모세포를 24-well plate에  $3 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 접종한 후 일정한 실험기간 동안 MTA를 처리하였다. 세포 생존은 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 세포 증식 분석을 사용하여 570nm에서 측정하였다.

#### **4. VonKossastaining**

치수 및 치은 섬유모세를 70% 에탄올로 1시간동안 고정시킨 후, 배양 접시를 증류수로 수세한 뒤 1% AgNO<sub>3</sub>를 20분 동안 처리하였다. 증류수로 수세 후 2.5% sodium thiosulfate를 5분간 처리하였다. 표본들은 대조염색 없이 또는 Mayer's hematoxylin 대조염색 후에 관찰하였다.

#### **5. Alkalinephosphataseactivity**

6-well plate에 well마다  $1 \times 10^5$ 의 밀도로 세포를 깔고, MTA 또는 transwell 만 포함한 배지에서 배양하였다. 배양 2-4일후, 세포를 PBS로 수세하고, 1 ml buffer (10 mM TRIS. HCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.1% NaNO<sub>3</sub>) 로 수집하여 3회 냉동(-20°C), 해동시켰다. 세포막을 부수기 위해 초음파처리하고 4°C에서 15분 동안 원심분리하였다. Alkaline phosphatase (ALP) 활성은 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 10.4) 에서 37°C에서 30분 동안 p-nitrophenyl phosphate 의 가수분해로 측정하였다. 흡광도는 측광기(spectrophotometer (Bio-Rad 3550 microplate Reader))로 405nm에서 측정하였다. 총 단백질 함량에 따라 ALP 활성을 보정하였고 (기준으로 소 혈청 albumin을 사용한 Bradford방법에 의해 결정) 총 단백질의 miligram마다 para nitrophenol의 nano mole로 표현하였다.

#### **6. 총 RNA 추출과 역전사중합효소연쇄반응**

총 RNA는 제조자의 지시에 따라 TRIzol시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 분리하였다. RNA의 확인은 변성된 agarose gel에서 전기영동(electrophoresis)으로 확인하였다. 석회화 관련 유전자의 발현을 확인하기 위해 반정량적 RT-PCR 분석을 수행하였다. 총 RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 분리하고, 제조자의 지시에 따라 SuperScript One-Step RT-PCR Systems (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.



RT-PCR에서 사용된 specific primer 서열은 표1에 기술하였다. RT-PCR은 다음과 같은 조건을 사용하여 수행하였다 : 50°C에서 30분간 1주기, 94°C에서 2분간 1주기, 그리고 94°C에서 30초간 30주기, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초, 72°C에서 10분간의 최종 연장. 대조 house-keeping 유전자인 GAPDH는 PCR 반응은 25주기 시행하였다. PCR의 산물은 1.5% agarose gel에 ethidium bromide으로 염색하여 관찰하였다.

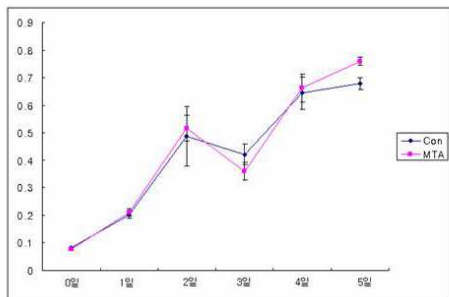
Table 1. Primers used for RT-PCR

Gene	Primers	Sequence (5' - 3')	Size (bp)
Alkaline phosphatase	Forward	GCACCTGCCTTACTAACTCC	626
	Reverse	CATGATCACGTC AATGTCC	
Osteonectin	Forward	ACTGAGAGCCCTCACACTGG	254
	Reverse	CAGCCAACTCGTCACAGTCC	
DSPP	Forward	GCAGTGATGAATCTAATGGC	488
	Reverse	CTGATTTGCTGCTGCTGTCTGAC	
GAPDH	Forward	CCAACCTCATCCATGACAACCTTG	464
	Reverse	GTCATACCAGGAAATGAGCTTGACA	

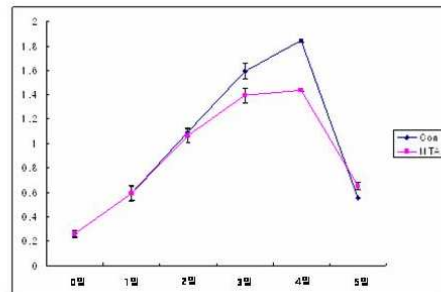
### III. 연구결과

#### 1. Cell Viability Assay (MTT Assay)

치수세포는 배양 5일후까지 세포 성장에 영향을 미치지 않았다. 5일 동안 MTA를 처리한 치수세포의 생존율은 대조군에 비해 다소 높았지만 통계적 의미는 없었다 (Fig. 2A). 이 결과는 MTA가 치수세포에 세포독성 반응을 유도하지 않음을 시사한다. 그러나 치은섬유모세포는 배양 4일까지는 세포성장을 유지하다가 5일째 감소하였다. MTA에 대한 영향은 대조군에 비해 생존율이 낮았지만 통계적 의미는 없었다 (Fig. 2 B).



(A)



(B)

Fig. 2. Survival and proliferation of dental pulp cells (A) and gingival fibroblasts (B) on MTA.

#### 2. VonKossa staining

Von Kossa 염색에 MTA를 처리 유무에 관계없이 두 세포 모두에서 석회화 결절은 형성되지 않았다 (data not shown).

### 3. Alkaline phosphatase activity

ALP의 활성도는 치수세포에서 MTA 처리와 상관없이 점차적으로 증가하였다 (Fig. 3A). 최대 효소 활성도는 대조군과 실험군 모두에서 배양 4일 후 관찰되었으나, MTA처리후 2일째는 대조군에 비해 오히려 지연되었다. 치은 섬유모세포에서는 ALP 활성도가 2일째는 같은 수준을 유지하다가 오히려 4일째는 MTA 처리군에 비해 대조군에서 높게 나타났다 (Fig. 3B).

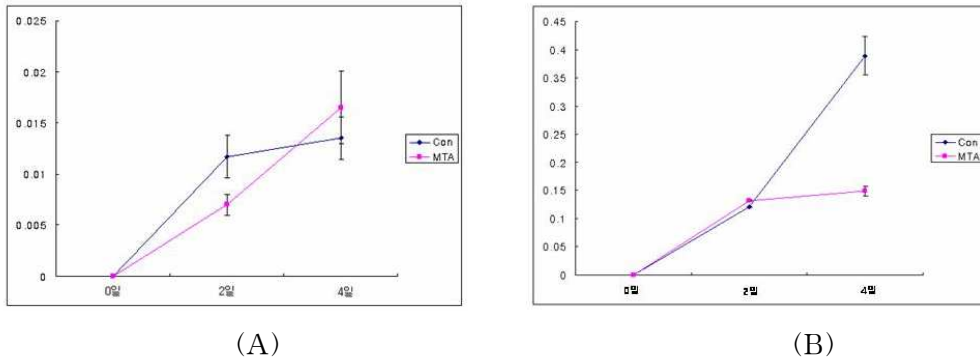
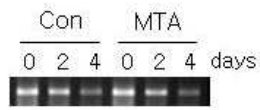


Fig. 3. Effect of MTA on alkaline phosphatase activity in dental pulp cells (A) and gingival fibroblasts (B).

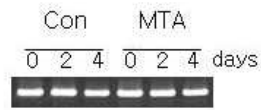
### 4. RT-PCR analysis

치수세포에서 MTA는 배양 2일 후 ALP의 발현에 아무런 영향을 미치지 않았지만, 배양 4일 후 발현이 증가하였다 (Fig. 4). 이러한 결과는 ALP assay과 동일하였다. ALP의 발현에 대한 효과와 유사하게, MTA는 전체 실험 기간 동안 DSPP의 발현도 증가시켰다. 그러나 대조군과 실험군간 발현 수준에는 차이가 없었다. 흥미롭게도, MTA에 4일간 노출된 치수세포에서 대조군에 비해 osteonectin의 발현이 통계학적으로 더 높았다 (Fig. 4, 5).

**Alkaline phosphatase**



**Osteonectin**



**DSPP**

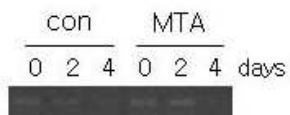


**GAPDH**

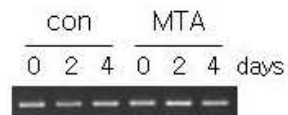


(A)

**Alkaline phosphatase**



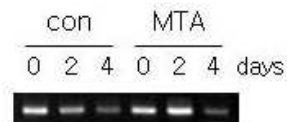
**Osteonectin**



**DSPP**



**GAPDH**



(B)

Fig. 4. Transcript alteration in dental pulp cells (A) and gingival fibroblasts (B) by MTA.

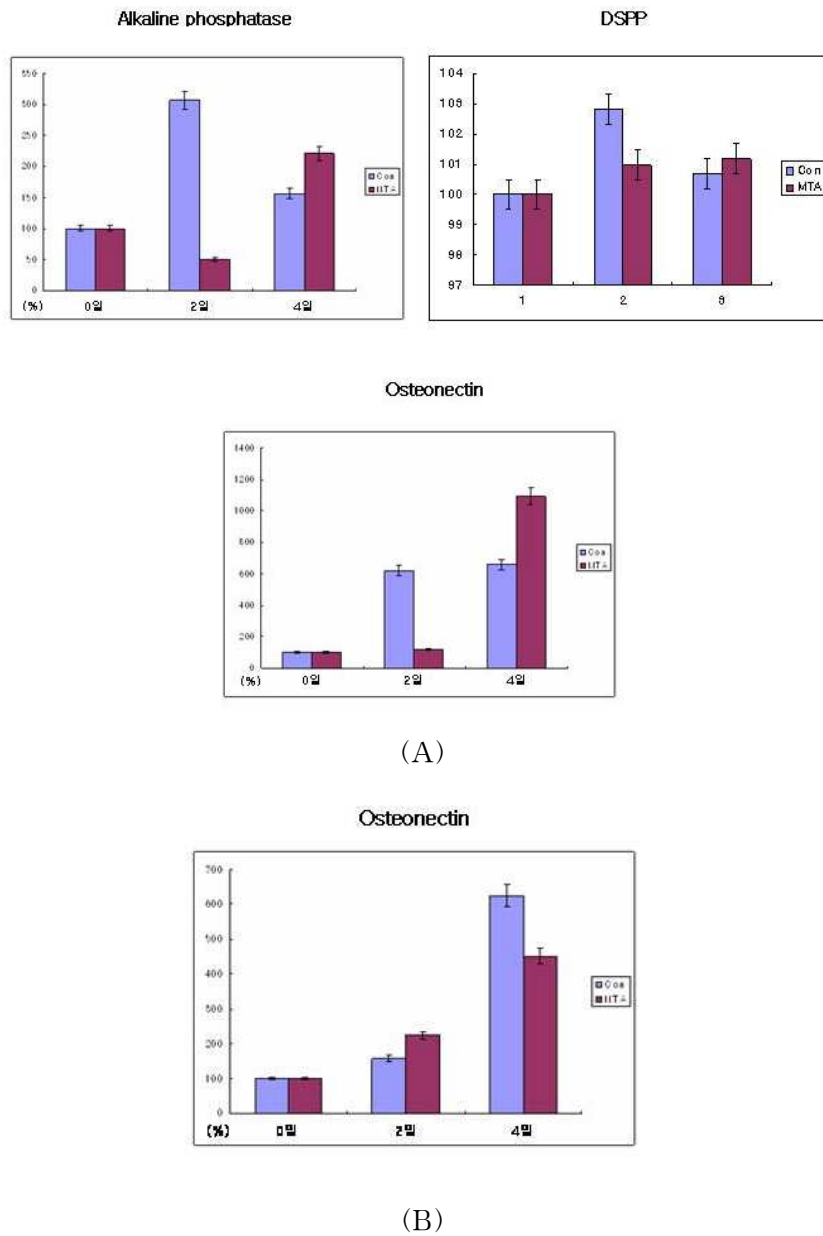


Fig. 5. Intensities of bands mRNA of dental pulp cells (A) and gingival fibroblasts (B) shown in Fig 4 were normalized with respect to those for GAPDH.

치은 섬유모세포에서는 ALP의 발현은 실험군과 대조군간 차이가 없었으며 DSPP는 전혀 발현되지 않았다 (Fig. 4). 그러나 MTA는 전체 실험 기간 동안 osteonectin의 발현을 증가시켰다. 그러나 MTA에 4일간 노출된 치은 섬유모세포에서 대조군에 비해 osteonectin의 발현이 더 낮았지만 통계학적인 유의성은 없었다 (Fig 4, 5).

## IV. 고 찰

1993년 치과 임상에 소개된 이래 MTA는 효과적인 치수복조제나(6,17), 치근 천공을 봉쇄하고 수복하는데 사용되어 왔고(18,19), 개방 근침을 가진 치아에서 치근단 방어벽(barrier)을 형성하는데 사용되어 왔다(10,11). 아울러 치근단 충전제로서의 성공도 보고되었다(12,13). 특히, MTA는 amalgam, IRM 또는 SuperEBA와 같은 재료와 비교했을 때, 봉쇄능력이 매우 우수하여 임상적 효용성이 높은 재료로 보인다(12,20). 최근의 연구에 의하면 MTA가 주변 조직에 생체친화성이 매우 높음이 입증되었다 (13,14). MTA는 골모세포의 활성을 촉진시키고(15), amalgam, IRM 또는 SuperEBA보다 세포독성이 더 적다(12,20). 아울러, MTA는 항균성을 가진 것으로 알려져 있다(21).

저자는 이 실험에서 MTA가 치수세포는 상아질 형성이나 석회화 물질과 관련된 유전자를 발현시켜, 치은 섬유모세포와는 다른 유전자가 발현되도록 유도할 것으로 가정하였다. 이는 조직학적으로 MTA가 사람과 개의 *in vivo* 실험에서 상아질 다리 형성이 관찰된다는 연구를 기초로 한 것이다(12,17). 이 연구의 결과 MTA에 의해 치수세포가 광화를 나타내는 유전자, 특히 ALP 그리고 osteonectin을 발현시킬 수 있다는 것을 관찰하였다. 그러나 치은 섬유모세포에서는 ALP의 발현은 두 군간 차이가 없었으며 DSPP는 전혀 발현되지 않았지만, MTA는 osteonectin의 발현은 증가시켰다. 그러나 MTA에 4일간 노출된 치은 섬유모세포에서 대조군에 비해 osteonectin의 발현이 더 낮았지만 통계학적인 유의성은 없었다. ALP는 phosphate를 방출하는 단백질로, 이것의 활성은 골 형성의 중요한 지표로 골모세포의 표현형 표지자로 여겨진다(22). MTA에 노출 후 ALP 전사수준이 ALP 활성의 인지할만한 증가에 앞서 최고점에 달한다는 것은 당연한 결과라 할 수 있다. 그러나, 전사 수준의 감소 후에 효소활성 수준이 증가한다는 것은 정확한 기전은 이 실험에서 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 ALP 활성의 기능적 수준 조절에 관하여 전사와 단백질 안정성의 상호관계에 관해 더 많은

연구가 필요하다(23).

상아질에서 발견되는 주요 교원질 단백질인 dentin sialoprotein (DSP)과 dentin phosphoprotein (DPP)은 치아 경조직의 석회화 조절에 중요한 역할을 담당한다. DSP와 DPP의 형성은 골모세포, 상아모세포, 백악모세포를 포함한 광화시키는 능력을 가진 세포들에 한정되어 발현된다(23). MTA와 대조군 모두에서 치수세포에서 dentin sialophosphoprotein (DSPP) 유전자 발현은 상아질 형성 과정이 *in vitro* 실험 조건하에서 발생할 수 있음을 시사한다. 이러한 결과는 MTA가 상아질 형성 과정과 일치하는 유전자와 단백질을 발현시킴으로써 상아질 유도 물질일 것이라는 기존의 *in vivo* 실험을 지지하는 소견이다. 이러한 연구 결과는 다른 치수치료제나 근관치료 제제와 비교시 MTA가 생물학적으로 안정성이 있고 생물학적 반응을 나타낸다는 다른 연구의 결과와 유사하였다(9,13,17).

이 연구에서 관찰한 유전자 중에서, ALP와 osteonectin이 광화와 가장 강하게 연관된 유전자이다. ALP의 활성은 정상적인 골모세포의 기능에 필수적이고(15), 일반적으로 광화의 초기 표지자로 여겨진다. 이 연구에서도 치수세포에 의한 ALP의 발현은 MTA와 대조군에서 2일과 4일째에 관찰되었다. 이러한 결과는 MTA가 상아질과 같은 석회화 물질을 형성하는 유전자를 발현되도록 한다는 것을 암시한다. 특히, osteonectin (SPARC)은 상아모세포에서 발현되는 calcium binding matricellular glycoprotein이다 (24,25). 다른 연구결과에서도 치수세포의 치유과정 동안에 SPARC의 증가가 관찰된다는 보고가 있다 (26). ALP는 석회화 조직을 만드는 세포에서 일반적으로 검출되는 효소이다(22,27). 더욱이, SPARC와 ALP 합성의 증가는 치수세포 분화의 표지자로 생각할 수 있다. 치은 섬유모세포에서는 ALP의 발현은 두 군간 차이가 없었으며 DSPP는 전혀 발현되지 않았다. 그러나 MTA에 4일간 노출된 치은 섬유모세포에서 대조군에 비해 osteonectin의 발현이 더 낮았지만 통계학적인 유의성은 없었다. 이는 치은 섬유모세포도 MTA 처리에 의해 석회화 물질을 형성할 수 있음을 시사하는 소견이다.

SPARC는 발육, 조직 개조, 그리고 수복과 관련된 phosphorylated glycoprotein이다(28). 최근 SPARC를 발현하는 유일한 치수세포인 상아모포가



3차 상아질 형성의 초기 단계에서 SPARC의 발현이 증가한다는 결과가 제시되었다(24-26). 상아질 형성에 있어 SPARC의 기능이 아직 완전히 알려져 있지 않지만, 상아모세포가 SPARC를 발현하여 일부 치수세포의 분화를 촉진시킴으로써 치아우식증이나 와동 형성 때문에 손상된 부위를 대치하수 있다는 논문도 있다(24). SPARC는 또한 상아질 형성을 위한 기질의 조절에 영향을 미치는 세포외 기질(extracellular matrix)과 matrix metalloproteinase의 생산을 조절한다(29,30). 더욱이, SPARC는 일부세포의 분화에 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(31). 따라서 이 연구에서 증명된 것처럼, 치수세포에서 MTA처리에 의한 SPARC와 alkaline phosphatase의 유전자 및 활성도의 상향조절(upregulation)은 이러한 세포들의 기능과 분화에 영향을 있음을 반영한다.

이 연구에서도 MTA가 치수세포에 세포독성 반응을 유도하지 않음을 시사하였다. MTA에 대한 영향은 대조군에 비해 생존율이 낮았지만 통계적 의미는 없었다. 치은 섬유모세포도 MTA에 의해 세포독성이 없음을 확인하였지만 배양 4일 까지는 세포성장을 유지하다가 5일째 감소하였다. 이는 치수세포에 비해 치은 섬유모세포의 성장이 더 빠르고 이로 인해 5일째는 세포가 더 풍요하게 증식하면 세포성장 속도는 느려질 수 있다고 생각하였다. Von Kossa 염색에 MTA를 처리 유무에 관계없이 두 세포 모두에서 석회화 결절은 형성되지 않았다. 이는 실험실 조건에서는 석회화 관련 유전자는 발현이 증가하지만 직접적으로 칼슘이 침착되지는 않아 추후 실험적으로 석회화를 유도하는 ascorbic acid나 b-glycerophosphate 또는 dexamethasone의 처리가 필요할 것으로 생각하였다.

## V. 결 론

임상적으로 MTA는 치수 및 치주조직 재생을 유도하지만, MTA가 치수 및 치은 섬유모세포 기능에 영향을 미치는 기전은 알려져 있지 않다. 특히, MTA가 세포학적으로 치수 및 치은 섬유모세포의 생존이나 초기에 발현되는 유전자에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 이 연구에서는 사람의 치수 및 치은 섬유모세포의 초기 생존에 어떠한 영향을 미치며 초기에 발현되는 유전자 변화 특히, ALP와 osteonectin 발현에 미치는 MTA의 효과를 비교 평가하기 위해 수행하였다.

결론적으로, 이 실험에 사용한 치수 및 치은 섬유모세포 배양 체계는 MTA 처리 후 상아질 재생에 기초가 되는 기전을 연구하는 데에 유용하고, 아울러 여러 가지 치과재료의 세포실험을 수행할 수 있는 모델로 사용할 수 있다. MTA에 노출은 치수 및 치은 섬유모세포에서 세포독성 반응을 유도하지는 않았다. MTA에 의해 치은 섬유모세포에서 ALP와 osteonectin이 증가하는 것으로 보아, 이로 인해 석회화 물질을 형성할 수 있을 가능성이 있다. 특히 치수세포에서 MTA의 처리는 ALP 활성과 osteonectin 합성을 증가시킴으로써 사람 치수세포의 분화에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각하였다.

## 참고문헌

1. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive and influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 1985;64:530-40.
2. Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol* 1995;39:281-90.
3. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000;28:77-92.
4. Smith AJ, Cassidy M, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995;39:273-80.
5. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:425-37.
6. Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF: Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:509-520.
7. Ham KA, Witherspoon DE, Gutmann JL, Ravindranath S, Gait TC, Opperman LA: Preliminary evaluation of BMP-2 expression and histologic characteristics during apexification with calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31:275-279.
8. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I: Physico-chemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31:97-100.
9. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PFE, Dezan JR E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with

- mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25:161-6.
10. Regan JD, Gutmann JL, Witherspoon DE. Comparison of Diaket and MTA when used as root-end filling materials to support regeneration of the periradicular tissues. *Int Endod J* 2002;35: 840-7.
  11. Economides N, Pantelidou O, Kokkas A, Tziafas. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) a root-end filling material. *Int Endod J* 2003;36:44-48.
  12. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root end filling in dogs. *J Endod* 1995;21:603-8.
  13. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasen SP. Histologic assessment of MTA as root end filling in monkeys. *J Endod* 1997;23:225-8.
  14. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1998;24:543-7.
  15. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;37:432-9.
  16. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LSW. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod* 2000; 26:404-6.
  17. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide a pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2003; 36:225-31.
  18. White Jr C, Bryant N. Combined therapy of mineral trioxide aggregate and guided tissue regeneration in the treatment of external root resorption and an associated osseous defect. *J Periodontol* 2002;73:1517-21.
  19. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabe PFE, Dezan JR

- E. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27:281-4
20. Keiser K, Johnson C, Tipton D. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregated using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2000; 26: 288-91.
  21. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000; 11: 3-9.
  22. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res* 1999; 34:123-127.
  23. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end Filling Materials Alter Fibroblast Differentiation. *J Dent Res* 2004; 83:408-13.
  24. Reichert T, Storkel S, Becker K, Fisher LW. The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int* 1992;50:468-72.
  25. Begue-Kim C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGFbs, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin, and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1994;38:405-20.
  26. Itota T, Nishitani Y, Sogawa N, Sogawa C, Konishi N, Torii Y. Alteration of odontoblast osteonectin expression following dental cavity preparation. *Arch Oral Biol* 2001; 46:829-34.
  27. Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986;39:382-5.
  28. Yan Q, Sage EH. SPARC, a multicellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999; 47:1495-505.

29. Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* 1993;121:1433-44.
30. Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor- $\beta$ 1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 1999;274:32145-52.
31. Bassuk JA, Birkebak T, Rothmier JD, Clark JM, Bradshaw A, Muchowski PJ, et al. Disruption of the Sparc locus in mice alters the differentiation of lenticular epithelial cells and leads to cataract formation. *Exp Eye Res* 1999;68:321-31.

## 저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20057478	과 정	박 사
성 명	한글: 노봉환    한문: 盧奉煥    영문: No, Bong-Hwan				
주 소	경기도 안양시 동안구 호계3동 859-15호 좋은치과의원				
연락처	E-MAIL : npbong85@hanmail.net				
논문제목	한글 : 치수와 치은 섬유모세포에서 Mineral Trioxide Aggregate (MTA)가 세포증식, Alkaline phosphatase, Osteonectin 발현에 미치는 영향 영문 : Effects of Mineral Trioxide Aggregate (MTA) on Cell Proliferation, Alkaline phosphatase and Osteonectin Expression of Dental Pulp and Gingival Fibroblast Cells				

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 의사표시가 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(       )

2007년    8월    일

저작자: 노봉환    (인)

## 조선대학교 총장 귀하