2009년 2월박사학위논문

상아질 기질단백질과 상아모세포 조건배양액이 백악모세포의 분화와 석회화에 미치는 영향

조선대학교 대학원

치의학과

이 경 연

상아질 기질단백질과 상아모세포 조건배양액이 백악모세포의 분화와 석회화에 미치는 영향

The effect of dentin non-collagenous protein and odontoblast conditioned medium on the differentiation and mineralization of cementoblast in vitro

*2009*년 *2*월 일

조선대학교 대학원 치의학과 이 경 연

상아질 기질단백질과 상아모세포 조건배양액이 백악모세포의 분화와 석회화에 미치는 영향

지도교수 김 흥 중

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2008년 10월 일

조선대학교 대학원 치의학과 이 경 연

이경연의 박사학위 논문을 인준함

위원장 서울대학교 교수 박 주 철 인 위 원 전북대학교 교수 조 의 식 인 위 원 조선대학교 교수 안 종 모 인 위 원 조선대학교 교수 임 성 훈 인

2008년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

도목차	ii
ABSTRACT	iii
<i>I.</i> 서론	1
Ⅱ. 재료 및 방법	3
Ⅲ. 결과	8
Ⅳ. 고찰	11
V. 참고문헌	14
사진부도 설명	19
사진부도	21

도 목 차

Fig.	1.	SDS-PAGE and western blot, proliferation,	
	8	and chemotaxis assay of dNCPs	21
Fig.	2.	Effect of dNCPs on the mineralization behavior of OCCM-30 cells after 4-, 7-, and 14-day cultures	22
Fig.	3.	Effect of dNCPs on gene expression of OCCM-30 cells analyzed by real-time PCR	23
Fig.	4.	Effect of conditioned media (CM) on the mineralization behavior of OCCM-30 cells after 7-day culture	24

ABSTRACT

The effect of dentin non-collagenous protein and odontoblast conditioned medium on the differentiation and mineralization of cementoblast in vitro

Lee, Koung-Youn

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

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Cementum is an important mineralized tissue in root formation. However, the precise mechanism of cementum formation is undefined. The purpose of this study was to evaluate the effect of dentin non-collagenous proteins (dNCPs) and odontoblast conditioned media (CM) on the differentiation and mineralization of cementoblastic OCCM-30 cells. The CM of ameloblastic ALCs, odontoblastic MDPC-23 and OD-11, osteoblastic MG-63, and fibroblastic NIH3T3 cells were transferred to OCCM-30 cells. dNCPs were extracted directly from porcine and human dentin and also applied to OCCM-30 cells. The results were evaluated by the morphologic appearance, expression of cementum matrix genes, and the formation of mineralized nodules in vitro.

dNCPs hardly influenced on proliferation, cell cycle modification, and chemotaxis of cementoblasts. Alizarin red-S staining detected the mineralized nodules in the control group from day 14, while mineralized nodules were detected in dNCPs treated group from day 7, which became gradually bigger and darker with time. Mineralization of cementoblasts was accelerated by CM from odontoblasts, MDPC-23 and OD-11. RT-PCR analysis revealed the earlier and stronger expression of BSP, ALP, and OC mRNAs in the MDPC23- and OD11-CM treated OCCM-30 cells than those of the control OCCM-30 cells. The level of gene expression was also significantly higher in the dNCPs treated group than in the control group. These results suggested that dentin matrix protein or the secreted products of odontoblasts induced cementoblast differentiation and mineralization. These findings may contribute to the development of a periodontal treatment including cementum regeneration.

Keywords:

cementoblast, mineralization, differentiation, dNCPs, odontoblast

백악질은 치근형성 과정에서 백악모세포에 의해 생성되며 백악질은 치주인대가 치근에 부착될 수 있게 한다. 치주조직의 재생 과정에서 백악질과 치주인대의 부착은 중요하다. 백악모세포는 치낭의 외배엽성 간엽세포에서 유래하는 것으로 알려져 있으며 백악질 기질 단백질을 분비한다¹⁾. 백악질 형성 과정은 크게 두 가지이론이 알려져 있다. 첫째는 Hertwig's 상피근초 (HERS) 사이로 침투해 들어온 치낭의 세포들이 주위의 HERS와 상아질로부터 유도작용을 받아 백악모세포로 분화하여 백악질을 형성한다는 것이다. 상아모세포가 풋상아질을 형성한 직후 HERS에 구멍이 나면 치낭의 안쪽 부분에 있던 외배엽성간엽세포가 구멍이 난 사이로들어와 풋상아질과 접촉하고 치근표면에 백악질을 형성하기 시작한다²⁾. 두 번째는 HERS가 상피-간엽 형질전환과정을 통해 백악모세포로 변화하여 유지된다는 것이다^{3,4)}. 그러나 현재까지 이와 같은 백악질 형성기전에 대한 다양한 연구에도 불구하고 백악모세포의 분화와 석회화 기전은 명확히 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 다양한 요인들 중 상아질과 백악질 사이의 관계에 주목하였다. 첫째, 백악질은 치근 상아질 표면 위에 침착되고 상아질과 같은 간엽세포 기원이다. 따라서 둘 사이에 상호작용을 촉진할 것으로 추정할 수 있다. 최근 상아질 기질 단백질을 상아모세포와 같은 기원을 가진 신경상피전구세포에 첨가하였을 때세포의 형태를 현저히 변화시킨다고 보고되었다⁵⁾.

둘째, 무세포성 백악질과 세포성 백악질 모두 상아질의 무기질 침착 이전에 침착이 진행된다는 것이다. Takano 등⁶⁾은 생쥐와 기니아피그에 치근 상아질의 석회화를 저해하는 HEBP (1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate)를 처리했을 때세포성 백악질이 형성되는 곳에서 세포성 백악질에 영향을 줄 것으로 추정되는 물질이 외피상아질의 석회화 전에 치주쪽으로 확산된다고 보고하였다. 셋째, 상아질형성에서 치주인대와 백악질의 형성이 요구된다는 것이다. 최근 Park 등⁷⁾은

nuclear factor I-C (Nfic)의 결손에 의한 상아모세포 분화의 차단이 비정상적인 치근을 형성한다고 보고하였다. Nfic 결손 생쥐에서는 비정상적인 치근 주변의 상아질 표면 부근에 백악모세포가 거의 관찰되지 않았으나 정상생쥐에서의 치근주위에서는 BSP를 발현하는 백악모세포가 많이 관찰되었다. 이것은 치근 상아질이 정상적인 백악질 형성에 필수적임을 제시하고 있다.

이러한 사실에 기초하여 상아질 기질이 백악모세포의 분화와 석회화에 영향을 미칠 것으로 보고 상아모세포 조건배지가 백악모세포의 분화와 석회화에 어떤 영 향을 줄 것인지 실험하였다. 또한 돼지와 사람의 치아에서 분리한 비아교질성 상 아질 단백질을 이용하여 백악모세포의 분화와 석회화에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주와 세포배양

치아의 해부학적인 위치에 근거하여 몇 가지의 세포주를 결정하였다. 상아모세포주로서 MDPC-23과 OD-11 (provided by Dr. Hanks, University of Michigan, MI)⁸⁾, 법량모세포주로서 ameloblast-lineage cells (ALCs, provided by Dr. T. Sugiyama, Akita Medical School, Japan)⁹⁾, 섬유모세포로서 NIH3T3, 그리고 골모세포주로 MG63을 사용하였다. 백악모세포주로 불멸화된 murine cementoblast인 OCCM-30 세포를 주 배양세포로 사용하였다¹⁰⁾. OCCM-30 세포는 10 mM HEPES (pH 7.2, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Co.) 그리고 100 IU/ml Penicillin - 100 μg/ml Streptomycin (Invitrogen Co.)을 포함한 DMEM 배지에 배양하였다. NIH3T3, MDPC-23은 OCCM-30 세포와 동일한 배지에서 배양하였다. ALCs, MG63은 MEM 배지를 사용하였고, ALCs는 epithelial growth factor (EGF, 50 ng/ml, R&D systems, Minneapolis, MN)를 첨가하였다. OCCM-30 세포의 분화와 석회화결절 형성을 유도하기 위하여 2주 동안 50 μg/ml ascorbic acid, 10 mM β-glycerophosphate, 그리고 5 mM dexamethasone을 첨가하였다.

2. 조건배지와 co-culture system

ALCs, MDPC-23, OD-11, MG63, NIH3T3 세포를 배양하여 각각의 세포가 분비한 물질을 포함하고 있는 배양액(조건배지)을 다시 OCCM-30 세포에 첨가하였다. ALCs-OCCM30, MDPC23-OCCM30, OD11-OCCM30, MG63-OCCM30, NIH3T3-OCCM30을 실험군으로 하고 조건배지를 넣지 않은 OCCM-30 세포를 대조군으로 실험하였다. ALCs, MDPC-23, OD-11, MG63, 그리고 NIH3T3 세포의

배지는 6시간 간격으로 교환하였다. 6시간 후 각 세포의 조건배지는 하루에 한 번 씩 새 배지와 1:1로 섞어 OCCM-30 세포에 넣어주었다. 대조군의 배지는 하루에 한 번 교환해주었다.

3. 비아교질성 상아질 단백질의 분리와 정제

조선대학교 치과대학에서 교정목적으로 발치한 사람의 치아와 실험용 돼지의 치아를 포화 sodium chloride 용액에 보관하였다가 증류수로 세척하여 건조하였다. 100% 알코올에 20시간 두었다가 다시 건조하고 치수와 표면은 제거하였다. 치아는 attrition mills (SK-30-SS, Munson, Utica, NY)를 이용하여 200-mesh particle의 가루로 만들었다. 단백질은 이전에 보고된 것과 같은 방법을 이용하여 분리하였다¹¹⁾. 분리한 단백질은 0.2 μm pore size filter를 이용하여 정제한 후 세포배양에 사용되었다. 단백질의 적정농도를 결정하기 위해서 다양한 농도의 단백질(10, 25, 그리고 50 μg/ml)을 OCCM-30 세포에 첨가하고 세포 생존율을 측정하였다.

4. 단백질 전기영동과 western 분석

10% acrylamide gel을 이용하여 30 μg의 단백질을 전기영동 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE)) 하였다. gel Gel은 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 transfer하여 0.1% tween-20을 포함한 PBS(PBS-T)에 skim milk가 5%가 되도록 녹인 blocking buffer로 blocking 하고 PBS-T로 세척 후 1:2500으로 희석한 anti-rabbit - DSP immunoglobulin (1:2500, Peptron, Korea)을 4℃에서 overnight 반응 시켰 다. Membrane 세척 후 horseradish peroxidase conjugated antir abbit-IgG (Santa 반응 후 Biotechnology, Santa CA)를 1시간 Cruz Cruz, enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)으로

확인하였다.

5. MTT 와 chemotaxis assay

OCCM-30 세포의 분화는 MTT {3 - (4, 5 - Dimethylthiazol - 2 - yl) - 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole} assay를 이용하여 측정하였다. OCCM-30 세포를 48 well plate에 한 well당 세포가 1 × 10³ cells/ml이 되도록 깔고 배양하였다. 24시간 후 비아교질성 상아질 단백질(10, 25, 50 µg/ml)을 각 농도 별로 첨가하였다. 비아교질성 상아질 단백질 첨가 후 1일, 2일, 그리고 3일 후에 MTT assay를 수행하였다. PBS로 세척 후 50 µℓ의 MTT를 각 well에 첨가하고 37℃에서 4시간 반응시켰다. MTT solution을 제거하고 DMSO 150 µℓ를 첨가한 뒤 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 두 번 반복하여 수행하였다.

서로 다른 세 가지 농도의 비아교질성 상아질 단백질이 OCCM-30 세포에 미치는 chemotactic 효과를 Heit 와 Kubes 실험법 12 에 따라 조사하였다. DMEM, 10% FBS 을 포함한 0.5% ultra-pure agarose solution 3 ml을 35 mm tissue culture dish에 넣은 뒤 gel 이 굳은 후 2 mm 간격으로 직경 3 mm로 구멍을 뚫어 well을 만들었다. well의 agarose를 제거하고 5% CO₂, 37° C 에서 한 시간 반응시켰다. 3 mm well 에 1×10^4 cells/ml의 OCCM-30 세포를 25 μ l 넣고 또 다른 well 에는 비아교질성 상아질 단백질을 처리한 후 (25 μ l of a 10, 25, 50 μ g/ml solution) 3 7° C, 5% CO₂ 에서 48시간 동안 키운 후 well을 광학현미경으로 관찰하였다.

6. Flow cytometry 분석을 통한 세포주기의 확인

Propidium iodide (PI) 염색후 DNA의 양을 flow cytometric quantification을 이용하여 세포주기를 분석하였다. 2일간 비아교질성 상아질 단백질을 처리한

OCCM-30 세포에 trypsin을 처리한 후 4℃에서 70% ethanol로 고정하여 RNase A (2 µg/ml)와 propidium iodide (10 µg/ml)를 포함한 PBS에 녹여 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 FACScalibur flow cytometry (BD Bioscience, San Jose, CA)로 분석하였다.

7. Total RNA 분리와 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

TRIzol reagent (Invitrogen Co.)를 이용하여 OCCM-30 세포에서 total RNA를 분리하고 RT Premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Bone sialoprotein (BSP), alkaline phosphatase (ALP), 그리고 osteocalcin (OC)의 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인하였다. Primer sequence는 다음과 같다. (F/R)BSP:(AAGAAAATGGAGACGGCGAT / CACCTGCTTCAGTGACGCTT), ALP: (CTCTCCGAGATGGTGGAGGT / GTCTTCTCCACCGTGGGTCT), OC: (CCACAGCCTTCATGTCCAAG / GGCAGAGAGAGAGAGACAGGG).

RT-PCR은 BSP (94℃: 12 min; 94℃: 30 s; 49.1℃: 1 min; 72℃: 30 s 35 cycle), ALP (94℃: 5 min; 94℃: 45 s; 62℃: 1 min; 72℃: 45 s 35 cycle), OC (9 4℃: 5 min; 94℃: 30 s; 63.5℃:1 min; 72℃: 30 s 35 cycle)의 조건으로 PCR 하였다. PCR후 전기 영동하여 확인된 band는 densitometry (Pharmacia Ultrascan XL, Pharmacia LKB)로 정량하였고 GAPDH (housekeeping gene)를 control로 사용하였다.

8. 형태학적 관찰과 Alizarin red-S 염색

세포의 형태학적인 특징, 배열 그리고 분화는 0, 4, 7, 14일 마다 inverted tissue culture microscopy (IMT2-21, Olympus, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

OCCM-30 세포의 석회화를 확인하기 위하여 alizarin red-S 염색을 하였다. 배양후 각 시기별로 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세 번 세척후 70% ethanol로 20분 동안 고정하였다. 고정 후 증류수로 세 번 세척하고 1% alizarin red-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) solution (in 0.1% NH4OH at pH 4.2~4.4)으로 염색한 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 실험군은 조건배지로 배양한 군과 비아교질성 상아질 단백질을 첨가하여 배양한 것으로 하여 0, 4, 7, 14 일에 각각 염색하여 관찰하였다.

9. 통계분석

조건배지와 비아교질성 상아질 단백질을 처리한 실험군과 각각의 대조군은 Student t test (P = 0.05)로 비교하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 비아교질성 상아질 단백질의 확인

분리한 비아교질성 상아질 단백질에 알려져 있는 상아질 기질 단백질 (dentin matrix protein)이 있는지 확인하기 위해서 단백질 전기영동을 수행하였다. Western blot 결과 상아질에 특이적인 비아교질성 상아질 단백질인 DSP가 확인되었다 (Fig. 1A). 이 단백질을 OCCM-30 세포에 처리한 결과 OCCM-30 세포의 중식은 대조군에 비해 저해 되었으나 (Fig. 1B), 이러한 차이가 통계학적으로 유의하지는 않았다. 세포주기 분석에서 비아교질성 상아질 단백질을 처리한 군 (46.79%)과 처리하지 않은 군 (43.85%) 사이의 G2/S/M 기간의 명확한 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 1C). 또한 chemotactic activity 분석에서 비아교질성 상아질 단백질을 처리한 군과 대조군 사이에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 1D).

비아교질성 상아질 단백질을 처리한 백악모세포의 석회화, 형태학적인 변화와 유전자 발현 변화 분석

Alizarin red-S 염색 결과 비아교질성 상아질 단백질을 처리한 군은 4일부터 염색된 결절이 관찰되었다 (Fig. 2). 반면 대조군은 14일부터 결절이 관찰되었고 결절의 수가 크게 증가하진 않았다. 10 μg/ml 농도로 처리한 군에서 결절의 수는 점차적으로 증가하였고 분화가 진행됨에 따라 크기가 커지고 색이 진해졌다. 25 μg/ml 과 50 μg/ml 농도로 처리한 군에서는 결절의 증가가 관찰되지 않았다.

현미경 관찰에서 비아교질성 상아질 단백질을 처리한 OCCM-30 군은 4일부터 다양한 지점에서 응집되고 유착되기 시작하였으나 대조군에서는 어떠한 변화도 보이지 않았다.

10 μg/ml 농도로 처리한 군에서 BSP, ALP 그리고 OC mRNA는 대조군보다 강하게 발현되었다(Fig. 3). BSP는 실험군과 대조군 모두 4일부터 발현되었다. 그러나 비아교질성 상아질 단백질을 처리한 군에서 더 강하게 발현되었다. ALP와 OC는 대조군과 실험군 모두 4일부터 발현되기 시작하였고 ALP와 OC의 발현 정도와패턴은 BSP와 유사하였다. 이 결과는 비아교질성 상아질 단백질이 OCCM-30 세포의 분화와 석회화를 촉진하고 있음을 보여준다.

3. 조건배지를 처리한 백악모세포의 석회화, 형태학적인 변화

Alizarin red-S 염색 결과 MDPC23-OCCM30, OD11-OCCM30 군에서는 7일부터 붉게 염색된 석회화 결절이 관찰되었다 (Fig. 4). 또한 석회화 결절은 분화와석회화가 진행됨에 따라 색이 짙어지고 염색된 부분이 많아지는 경향을 보였다. 그러나 MDPC23-OCCM30과 OD11-OCCM30 군을 제외한 나머지 군에서는 14일까지 석회화 결절이 관찰되지 않았다. 4개의 실험군 중 MDPC23-OCCM30과 OD11-OCCM30 군이 4일째부터 한 지점으로 밀집하였고 5일에서 7일째에 결절이관찰되었다 (data not shown). 백악질 석회화의 특이적인 마커인 BSP, ALP 그리고 OC의 유전자 발현은 대조군 대조군에 비해 MDPC23-OCCM30과OD11-OCCM30 군에서 더 빨리 발현되었다.

BSP는 MDPC23-OCCM30군과 OD11-OCCM30군은 4일부터 발현되었으나 대조군에서는 14일부터 발현 되었다. 또한 MDPC23-OCCM30 군과 OD11-OCCM30 군에서 ALP와 OC는 각각 4일과 7일부터 발현 되었다. 반면 대조군의 ALP와 OC는 14일부터 발현되었다. MG63-OCCM30 군에서 OC, ALP 그리고 BSP는 4일, 7일 그리고 14일부터 각각 발현되기 시작하였다 (data not shown). ALCs-OCCM30 군에서 ALP와 OC는 대조군 보다 빠른 4일과 7일에 발현되었다. 그러나 BSP는 대조군과 유사하게 14일까지 발현되지 않았다 (data not shown). 이들 결과는 MDPC23-OCCM30 그리고 OD11-OCCM30 실험군에서 분화와 석회화가 촉진되었

음을 보여주고 있다.

Ⅳ. 고 찰

최근에 상아질이 백악모세포의 분화와 석회화에 영향을 미친다는 연구 결과들이 보고되고 있다. Cho 등¹³⁾은 초기 상아질 형성 과정 중 분비된 세포외 상아질 기질 또는 안쪽 기저막에서 유래한 chemoattractant 물질 모두 상아질 표면쪽으로 백악모세포 전구세포의 이동과 분화를 유도한다고 주장하였다. MacNeil과 Thomas 등 ¹⁴⁾은 HERS의 붕괴로 치낭의 외배엽성 간엽세포가 침투하여 상아질과 접촉하게되고, 백악질과 치주조직을 형성할 것이라 주장하였다. 또한 novel dentin chamber model에서 티타늄 임플란트를 이용한 임상시험 결과 상아질이 남아 있는 경우 이들의 유도를 통하여 백악질을 포함한 치주조직이 임플란트 표면에 부착된다고 하였다¹⁵⁾. 본 실험에서도 백악질 형성기전에 관한 다양한 이론 중에서 상아질 기질과백악질 사이의 관계에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다. 치아에서 분리한 비아교질성 상아질 단백질이 백악모세포의 분화와 석회화에 영향을 나타냈으나, 백악모세포의 증식, 세포주기, 그리고 chemotactic에는 영향을 미치지 않았다. 이 결과는비아교질성 상아질 단백질의 특정 요소가 백악모세포의 분화를 유도하고 석회화를 촉진시킨 결과를 나타낸 것으로 볼 수 있다.

기질소포는 치수주위 상아질과 법랑질을 제외한 뼈, 외피상아질, 그리고 세포성 백악질 같은 경조직의 석회화 과정에서 중요한 역할을 한다^{16,17)}. 따라서 상아모세포나 골모세포의 조건배지에 포함된 기질소포가 백악모세포의 석회화에 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있다. 그러나 본 실험에서 석회화 결절은 골모세포 조건배지를 처리한 군에서는 14일까지 나타나지 않았다. 이것은 골모세포 조건배지가 백악모세포의 석회화를 촉진하지는 않음을 보여주고 있다. 따라서 백악모세포의 석회화가 기질소포가 아닌 상아모세포가 분비한 신호전달 물질 또는 특정 수용성 요인에 의해 촉진된 것이다. 이는 상아모세포의 특정 메커니즘에 의해 백악모세포의 분화와 석회화가 유도됨을 나타낸다.

BSP는 백악모세포의 분화에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. BSP는

치근표면세포의 부착과 초기 석회화에 관여 하는데, 백악질 형성 과정 중 치근표면에 위치하여 백악모세포 전구세포를 끌어들이고 이들을 잘 부착하고 분화할 수 있도록 한다¹⁸⁾. ALP는 세포에서 기질에 인산기를 전달하고 석회화를 억제하는 요인을 제거하며 백악모세포의 초기 표지자로 여겨지고 있다¹⁹⁾. OC는 골모세포와 백악모세포 분화의 후기에 나타나는 표지자로 석회화 결절의 양을 조절한다고 알려져 있다²⁰⁾. 본 실험에서 MDPC23-OCCM30 군과 OD11-OCCM30 군에서의 BSP발현은 4일째부터 나타났으나 대조군은 14일부터 나타났다. ALP와 OC의 발현은 MDPC-23 와 OD-11 세포에 의해 촉진되었다. 이것은 백악모세포의 분화와 석회화는 상아모세포 계통 세포인 MDPC-23와 OD-11에 의해 촉진됨을 시사한다. 즉상아모세포가 분비한 물질이 백악모세포의 분화와 석회화를 촉진하는 것을 증명하고 있다.

상아질 기질을 이용한 연구는 최근까지 상아질에서 BMP를 추출²¹⁾하여 연골형성을 촉진²²⁾하거나 발치후의 치유를 촉진²³⁾할 목적으로 이루어져 왔다. 본 실험에서는 비아교질성 상아질 단백질을 사람과 돼지의 치아에서 분리하여 이들이 백악모세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 OCCM-30 세포에 처리하였다. 석회화 결절은 대조군에 비해 비아교질성 상아질 단백질을 처리한 군에서 더 일찍 형성되었고 더 많은 결절을 형성하였다. 또한 BSP, ALP 그리고 OC의 발현도 더 강하게나타났다. 이 결과는 비아교질성 상아질 단백질이 백악모세포의 분화와 석회화를 유도하고, 조건배지를 사용한 실험보다 상아질의 효과를 확인하는데 있어서 좀 더효과적인 방법임을 보여주고 있다.

본 실험에서는 비아교질성 상아질 단백질을 25 μg/ml, 50 μg/ml 농도로 처리한 군보다 10 μg/ml 을 처리한 군에서 더 많은 석회화 결절이 관찰되었고 25 μg/ml, 50 μg/ml을 처리 했을 때 석회화 결절이 증가하는 경향이 나타나지는 않았다. Foster 등²⁴⁾은 inorganic phosphate (Pi)에 의한 백악모세포의 유전자 발현조절에 관한 실험에서 투여량의 중요성을 강조하였다. 예를 들어 5 mM Pi가 세포의 반응을 보이는데 가장 효과적이었고 7 mM, 10 mM은 세포에 스트레스를 주는 조건이

되는 것으로 보고하였다. 이와 유사하게 10 μ g/ml 농도로 처리한 것이 백악모세포의 실험에서는 가장 적절한 농도로 보인다. 그러나 향후 백악질 형성에서 가장 최적화된 효과를 보이는 농도에 관해서는 보완 연구가 필요할 것이다.

법랑질을 형성하는 세포들에서 기원한 HERS가 상피-간엽 상호작용을 통해 백악질 형성의 조절에 관여할 것이라는 논리를 바탕으로 백악질을 포함한 치주재생에서 법랑기질의 역할에 관한 많은 연구들이 이루어져 왔다²⁵⁻²⁸⁾. 그러나 치주조직재생에서 법랑질 기질의 역할에 관하여는 서로 상반된 연구결과들이 도출되고 있다²⁹⁻³¹⁾. 따라서 아직까지 법랑질 기질이 백악질의 형성에 미치는 영향에 관해서는 논란이 많다. 본 실험에서는 백악모세포에 법랑모세포 조건배지를 처리한 실험군에서는 백악모세포의 석회화가 촉진되지 않았다. 유전자 발현 분석 또한 법랑모세포 조건배지를 처리한 군에서 백악모세포의 분화는 촉진되지 않았다. 법랑모세포 조건배지에 의하여 ALP와 OC의 발현은 다소 증가하였으나, BSP의 발현과 석회화는 촉진되지 않았다. 이 결과는 법랑질 단백질이 백악모세포에 영향을 미치지만,이들이 백악모세포를 분화시키거나 석회화를 촉진하는 것과는 관련이 적음을 나타낸다.

결론적으로 본 실험에서 상아질 기질 단백질 또는 상아모세포의 분비물질은 백 악모세포의 분화와 석회화를 촉진하였다. 이는 상아질 기질을 이용한 백악질의 재 생에 대한 새로운 가능성을 시사하였다. 그러나 이 결과를 임상적으로 응용하기 위해서는 백악질의 형성에 영향을 미치는 특정 인자를 비아교질성 상아질 단백질 에서 동정하는 등의 보완 실험이 필요할 것이다.

VI. 참고문헌

- 1. Cho MI, Garant PR. Radioautographic study of [3H]mannose utilization during cementoblast differentiation, formation of acellular cementum, and development of periodontal ligament principal fibers. Anat Rec 1989; 223:209–222.
- 2. Slavkin HC, Bringas P Jr, Bessem C, Santos V, Nakamura M, Hsu MY et al. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molar using serum-less, chemically-defined medium. J Periodontal Res 1989;24:28-40.
- 3. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. Periodontol 2000 1997;13:41-75.
- 4. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan S A. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. J Periodontal Res 1994;29:81–94.
- 5. Struys T, Krage T, Moreels M, Vandenabeele F, Rabb WHM, Smitj AJ et al. Effect of dentin matrix protein on the in vitro differentiation of spinal cord derived neuro-epithelial precusor cells. Dental/pulp complex meeting (abstract). Düsseldorf, Germany. 2005;21.
- 6. Takano Y, Sakai H, Watanabe E, Ideguchi-Ohma N, Jayawardena CK, Arai K et al. Possible role of dentin matrix in region-specific deposition of cellular

and acellular extrinsic fibre cementum. J Electron Microsc (Tokyo) 2003;52:573-580.

- 7. Park JC, Herr Y, Kim HJ, Gronostajski RM, Cho MI. Nfic gene disruption inhibits differentiation of odontoblasts responsible for root formation and result in formation of short and abnormal roots in mice. J Periodontol 2007;78:1795–1802.
- 8. 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.
- 9. Nakata A, Kameda A, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, et al. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. Biochem Biophys Res Commun 2003;308:834-839.
- 10. D'Errico JA, Berry JE, Ouyang H, Stayhorn CL, Windle JJ, Somerman MJ. Employing a transgenic animal model to obtain cementoblasts in vitro. J Periodontol 2000;71:63–72.
- 11. Smith AJ, Leaver AG. Non-collagenous components of the organic matrix of rabbit incisor dentine. Arch Oral Biol 1979;24:449-454.
- 12. Heit B, Kubes P. Measuring chemotaxis and chemokinesis: the under-agarose cell migration assay. Sci STKE. 2003;170:PL5.

- 13. Cho MI, Garant PR. Ultrastructural evidence of directed cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. J Periodontal Res 1988;23:268–276.
- 14. MacNeil RL, Thomas HF. Development of the murine periodontium. II. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. J Periodontol 1993;64:285–291.
- 15. Parlar A, Bosshardt DD, Unsal B, Cetiner D, Haytac C, Lang NP. New formation of periodontal tissues around titanium implants in a novel dentin chamber model. Clin Oral Implants res 2005;16:259–267.
- 16. Takano Y, Sakai H, Baba O, Terashima T. Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum. Bone 2000;26:333-339.
- 17. D. S. Howell, BD. Boyan. Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan-degrading metalloproteinases after addition of 13-glycerophosphate and ascorbic acid. Calcif Tissue Int 1994;54:399-408.
- 18. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. Crit Rev Oral Biol Med 1999;10:79-98.
- 19. Bachra BN. Calcification of connective tissue. Int Rev Connect Tissue Res 1970;5:165–208.

- 20. Karsenty G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. Semin Cell Dev Biol 2000;11:343-346.
- 21. Mizutani H, Mera K, Ueda M, Iwata H. A study of the bone morphogenetic protein derived from bovine demineralized dentin matrix. Nagoya J Med Sci 1996;59:37–47.
- 22. Rabinowitz T, Syftestad GT, Caplan AI. Chondrogenic stimulation of embryonic chick limb mesenchymal cells by factors in bovine and human dentin extracts. Arch Oral Biol 1990;35:49–54.
- 23. Gomes MF, Abreu PP, Morosolli AR, Araújo MM, Goulart MG. Densitometric analysis of the autogenous demineralized dentin matrix on the dental socket wound healing process in humans. Pesqui Odontol Bras 2006;20:324–330.
- 24. 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.
- 25. Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. J Periodontol. 2001;72:679-87.
- 26. Schonfeld SE, Slavkin HC. Demonstration of enamel matrix protein on root
 analogue surfaces of rabbit permanent incisor teeth. Calcif Tissue

- 27. Fong CD, Slaby I, Hammarström L.Amelin: an enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial sheath. J Bone Miner Res 1996;11:892-898.
- 28. Boabaid F, Gibson CW, Kuehl MA, Berry JE, Snead ML, Nociti FH Jr, et al. Leucine-rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule cementogenesis. J Periodontol 2004;75:1126-1136.
- 29. Bosshardt DD, Sculean A, Windisch P, Pjetursson BE, Lang NP. Effects of enamel matrix proteins on tissue along the roots of human teeth. J Periodontal Res 2005;40:158–167.
- 30. Shimizu E, Saito R, Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, et al. Amelogenin stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through fibroblast growth factor 2 response element and transforming growth factor-betal activation element in the promoter of the BSP gene. J Periodontol 2005;76:1482–1489.
- 31. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL. Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, et al. Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. J Periodontol 2003;74:1423-1431.

사진부도 설명

Fig. 1. SDS-PAGE and western blot, proliferation, and chemotaxis assay of dNCPs. (A) SDS-PAGE gels were stained with Coomassie blue reagent (left panel): lane 1, marker; lane 2, dNCPs lane 3, MDPC-23 conditioned media (CM); lane 4, OD11-CM. Western blot (right panel) showing dentin marker gene, DSP, in extracted dNCPs (lane 1), MDPC23-CM (lane 2), and OD11-CM (lane 3). (B) Growth curves of control, dNCP-treated OCCM-30 (left panel) and MDPC-23 cells (right panel) by MTT assay. The proliferation of dNCP-treated OCCM-30 cells was slightly diminished compared to the control (p < 0.05). (C) Representative cell cycle distribution by flow cytometry. dNCP-treated OCCM-30 cells demonstrated no cell cycle modifications (upper panel). 75.57% of the cells were arrested in G0/G1 phase, indicating the inhibitory effect in dNCP-treated MDPC-23 cells (lower panel). (D) Chemotaxis assay. dNCP treatment did not stimulate the chemotactic activity of OCCM-30 cells. The data were expressed as the number of migrating cells ± SEM from three separate experiments.

Fig. 2. Effect of dNCPs on the mineralization behavior of OCCM-30 cells after 4-, 7-, and 14-day cultures. Mineralized nodule formation in 35-mm culture dishes (A) and their magnified photographs (B) Positively stained nodules appeared in the dNCP-treated group starting on day 4, whereas they did not appear in control group at that time. The number of stained nodules in the dNCP-treated group increased more markedly than in the control group. Control, normal OCCM-30 (a, b, c, d) dNCPs, 10μg/ml dNCP-treated OCCM-30 (a′, b′, c′, d′). Alizarin red S stain. B: magnification: ×40.

Fig. 3. Effect of dNCPs on gene expression of OCCM-30 cells analyzed by real-time PCR. Expression of BSP (A), ALP (B), and OC (C) mRNAs. Bars represented the mean \pm SEM from three separate experiments, with similar results. Asterisks (*) denote a value as significantly different (P < 0.05) from the controls. Control, normal OCCM-30; dNCPs, 10μ g/ml dNCP- treated OCCM-30.

Fig. 4. Effect of conditioned media (CM) on the mineralization behavior of OCCM-30 cells after 7-day culture. Mineralized nodule formation in 35-mm culture dishes (A) and their magnified photographs (B). (a) Control, normal OCCM-30; (b) ALCs-OCCM30, ALCs-CM treated OCCM-30; (c) MDPC23-OCCM30, MDPC23-CM treated OCCM-30; (d) OD11-OCCM30, OD11-CM treated OCCM-30; (e) MG63-OCCM30, MG63-CM treated OCCM-30 and (f) NIH3T3-OCCM30, NIH3T3-CM treated OCCM-30. Note mineralized nodules in (c) and (d), as indicated by alizarin red-S stain. B: magnification: ×40.

Fig. 1.

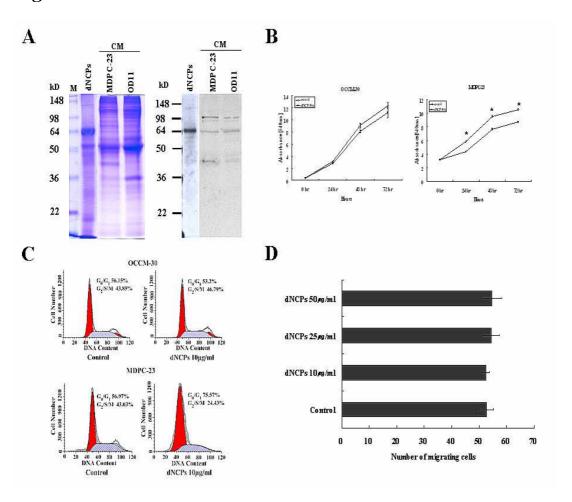


Fig. 2.

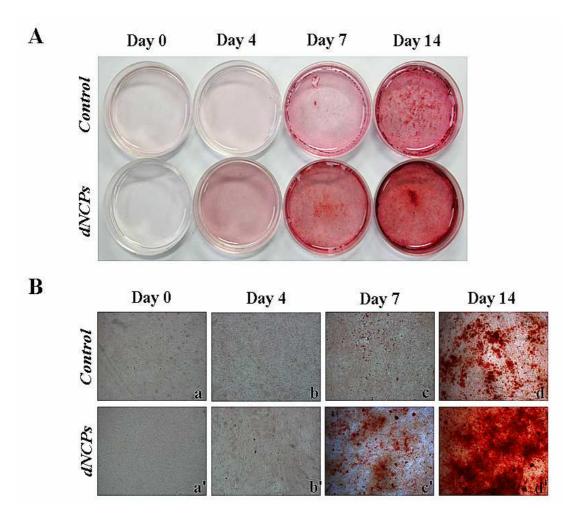


Fig. 3.

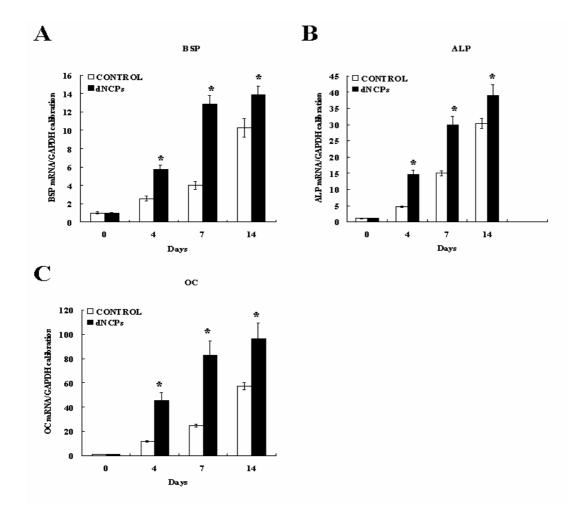
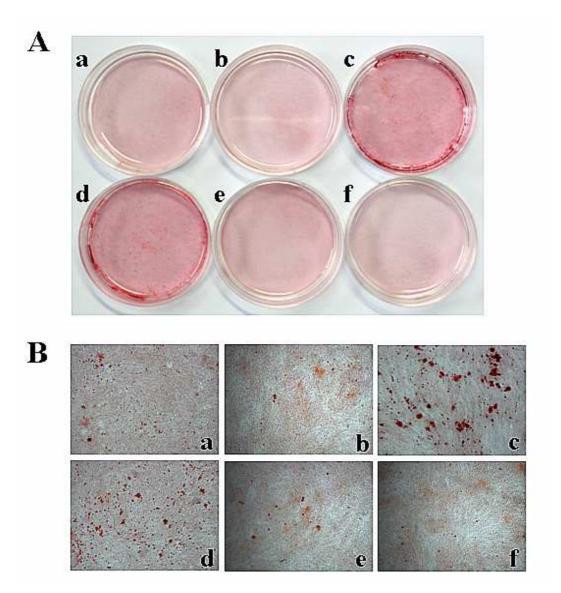


Fig. 4.



저작물 이용 허락서				
학	과	치의학과 학 번 20077385 과 정 박사		
성	명	한글 : 이경연 영문: Lee, Koung-Youn		
주	- 소 158-050 서울 양천구 목동 912번지 목동 신시가지아파트 515-505			
연락처		E-MAIL:		
논문제목		한글: 상아질 기질단백질과 상아모세포 조건배양액이 백악모세포의		
		분화와 석회화에 미치는 영향		
		영문: The effect of dentin non-collagenous proteins and		
		odontoblast conditioned media on the differentiation and		
		mineralization of cementoblasts in vitro		

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()

2008년 12월 일

저작자: 이 경 연 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하