



### 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



2010년 8월  
석사학위논문

배양 상아질모세포 분화에 미치는  
키토산의 효과

조선대학교 대학원

치의학과

박 주 현

# 배양 상아질모세포 문화에 미치는 키토산의 효과

Effect of chitosan  
on cultured odontoblast differentiation

2010년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

박 주 현

# 배양 상아질모세포 분화에 미치는 키토산의 효과

지도교수 김 도 경

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2010년 4월 일

조선대학교 대학원

치의학과

박 주 현

# **박주현의 석사학위 논문을 인준함**

위원장      조선대학교      교수      김    흥    중    인

위원      조선대학교      교수      국    중    기    인

위원      조선대학교      교수      김    도    경    인

2010년    5월    일

**조선대학교 대학원**

# 목 차

표목차.....	iii
도목차.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. 서론.....	1
II. 실험재료 및 방법.....	3
1. 실험재료.....	3
2. 상아질모세포의 배양과 분화.....	3
3. 역전사 중합효소연쇄반응 분석.....	4
4. Alizaline red-S 염색.....	4
III. 실험결과.....	6
1. 상아질모세포 분화과정에서 분화 특이유전자들의 발현에 미치는 키토산의 효과.....	6
2. 상아질모세포 분화과정에서 세포형태의 변화에 미치는 키토산의 효과.....	7
3. 상아질모세포 분화과정에서 석회화 결절형성에 미치는 키토산의 효과.....	8

IV. 총괄 및 고안.....	9
V. 결론.....	12
VI. 참고문헌.....	13
VII. 사진부도 설명.....	19
VIII. 사진부도.....	21

## 표 목 차

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

## 도 목 차

Fig. 1. Effect of chitosan on alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression.....21

Fig. 2. Effect of chitosan on type I collagen (Col I ) mRNA expression.....22

Fig. 3. Effect of chitosan on osteonectin (ON) mRNA expression.....23

Fig. 4. Change of cell morphology in MDPC-23 cells.....24

Fig. 5. Mineralized nodule formation in MDPC-23 cells.....25

# **ABSTRACT**

## **Effect of chitosan on cultured odontoblast differentiation**

**Park, Ju-Hyun**

**Advisor: Prof. Kim, Do Kyung, 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. Chitosan is the N-deacetylated derivative of chitin and has been recommended as a functional material because of its biocompatibility, biodegradability, non-toxicity and adsorption properties. Several bioactivities such as antitumor activity, cholesterol-lowering effects, immunoenhancing effects, antidiabetic effects, wound healing effects, antifungal activities and antimicrobial activities of chitosan also have been known. Although numerous literatures are available on the pharmacological and biological activities, the biological activity of

chitosan in tooth formation process has not yet been well defined. In this study, the effect of chitosan was, therefore, investigated in the differentiation of MDPC-23 cells derived from mouse dental papilla cells.

To determine the characteristic alteration of MDPC-23 cells by chitosan in the differentiation of MDPC-23 cells, it was examined by RT-PCR, observation of cell morphology and Alizaline red-S staining after inducing experimental differentiation in MDPC-23 cells. The results are as follows.

1. Chitosan significantly increased and accelerated the expression of ALP mRNA as compared with the control in a time-dependent manner in the differentiation of MDPC-23 cells.
2. Chitosan significantly accelerated the decrease of Col I mRNA expression as compared with the control in a time-dependent manner in the differentiation of MDPC-23 cells.
3. Chitosan significantly accelerated the decrease of ON mRNA expression as compared with the control in a time-dependent manner in the differentiation of MDPC-23 cells.
4. Chitosan significantly accelerated the mineralization as compared with the control culture in the differentiation of MDPC-23 cells.

These results suggest that the chitosan facilitate the odontoblast differentiation and mineralization in the differentiation of MDPC-23 cells, and therefore, that it may have potential properties for development and its clinical application of dentin regeneration materials.

# 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>.

상아질은 치아의 가장 중요한 구성 성분으로 치관과 치근의 대부분을 구성하며, 상아질모세포는 제Ⅰ형과 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 상아세판에 묻히게 되고, 결과적으로 상아질모세포는 치수 가장자리 상아질의 내면에 위치하여 상아질을 유지하게 된다<sup>6)</sup>. 그러나 상아질모세포의 분화기전과 상아질의 형성과정을 조절하는 인자 그리고 그와 관련된 분자생물학적 기전은 아직까지 명확히 알려져 있지 않다.

자연계에 풍부하게 분포하는 키틴(poly- $\beta$ -(1→4)-N-acetyl-D-glucosamine)은 주로 게나 새우 같은 절지동물의 껍질로부터 추출할 수 있는 고분자의 천연물질이며, 이 키틴을 탈아세틸화한 물질이 키토산(poly- $\beta$ -(1→4)-D-glucosamine)이다. 키토산은 다가의 양이온성 고분자로서 무독성, 생체 적합성, 생체 분해성 및 낮은 항원성 등과 같은 생

체 친화성이 우수하고<sup>7-12)</sup>, 창상치유 촉진<sup>13)</sup>, 세포활성 강화<sup>13,14)</sup>, 면역능력 보강<sup>13,14)</sup>, 세균 발육 억제<sup>15)</sup>, 콜레스테롤 저하<sup>16,17)</sup>, 종양억제<sup>18,19)</sup> 및 구강 내 연쇄상구균의 흡착방지<sup>15)</sup> 등과 같은 생물학적 기능으로 인하여 의학 및 치의학 영역에서 활발하게 연구되고 있다. 또한 키토산이 알카린포스파타제의 활성도를 증가시켜 골전도를 유도한다는 보고도 있으며, 키토산을 이용하여 차단막을 만들어 골 결손부의 골재생을 유도하는 연구도 진행되고 있다<sup>20,21)</sup>. 그러나 키토산의 직접적인 골유도 여부에 관해서는 아직 알려져 있지 않으며, 치아형성 과정에서 키토산의 생물학적 기능도 명확하게 밝혀지지 않았다.

상아질 재생이란 외상 또는 치아우식 등에 의해 손상된 상아질을 형성하게 하여 치아가 건강하게 유지되도록 하는 것으로, 최근 상아질 재생에 대한 관심이 높아지면서 이와 관련한 연구가 활발히 진행되고 있으나 상아질의 특수성과 여러 가지 실험적 제한으로 인하여 연구결과는 매우 미미한 실정이다<sup>22)</sup>. 기존의 문제점을 해결하기 위해서 생물공학·조직공학을 이용한 상아질 재생 유도물질의 개발이 향후 상아질 재생연구의 핵심이 될 것으로 사료되며<sup>22)</sup>, 이를 위해서는 상아질모세포의 분화기전을 이해하는 것이 필수요소라 생각된다.

상아질모세포 연구에 널리 이용되고 있는 MDPC-23 세포주는 Hanks 등(1998)<sup>23,24)</sup>이 CD-1 생쥐 어금니의 치유두를 이용하여 만든 세포주로서, 일정조건에서 배양하면 상아질모세포의 특성을 나타낸다는 것을 확인<sup>25)</sup>한 세포주이다.

본 연구에서는 상아질모세포로서 MDPC-23 세포주의 분화과정에서 키토산에 의한 MDPC-23 세포주의 특성변화를 분석하여, 상아질 재생 유도물질 개발의 토대를 제공하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

저분자 수용성 키토산(분자량 1kDa)은 순천대학교 공과대학 나노·신소재응용공학부 나재운 교수로부터 제공받아 실험에 사용하였다<sup>26,27)</sup>. 본 연구를 위한 예비실험에서, 수용성 키토산 1, 3, 10, 30 및 100 $\mu$ M의 MDPC-23 세포주 분화에 미치는 효과를 조사한 결과, 수용성 키토산 10 $\mu$ M 처리군에서부터 대조군과 차이를 보이기 시작하였다. 따라서 본 연구에서는 수용성 키토산의 효과가 나타나기 시작한 가장 낮은 농도인 10 $\mu$ M을 이용하여 MDPC-23 세포주 분화에 미치는 여러 가지 효과를 조사하였다.

### 2. 상아질모세포의 배양과 분화

본 연구에서는 상아질모세포로서 생쥐 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주<sup>23,24)</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 $\mu$ l/ml)와  $\beta$ -glycerophosphate(10mM)를 첨가하여 배양하면서 실험에 이용하였다<sup>28)</sup>.

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

세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 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 5μg의 total RNA를 reverse-transcriptase(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 oligo(dT) primer를 이용하여 42°C에서 60분간 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA를 alkaline phosphatase(ALP), type I collagen(Col I) 및 osteonectin(ON) 등의 primer(Table 1)를 이용하여 중합효소연쇄반응(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 30주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 각 primer의  $T_m$  값을 고려하여 ON의 결합반응 온도는 52°C, GAPDH의 결합반응 온도는 54°C, ALP와 Col I의 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 각 실험군의 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.

**Table 1. Primer sequences for PCR**

Primer Names	Sequence (5'→3')	PCR Product (bp)
ALP (sense)	CTCTCCGAGATGGTGGAGGT	430
ALP (antisense)	GTCTTCTCCACCGTGGGTCT	
Col I (sense)	GTGAACCTGGCAAACAAGGT	411
Col I (antisense)	CTGGAGACCAGAGAAGCCAC	
ON (sense)	ACATGGGTGGACACGG	405
ON (antisense)	CCAACAGCCTAATGTGAA	
GAPDH (sense)	TGCATCCTGCACCAACT	349
GAPDH (antisense)	CGCCTGCTTCACCACCTTC	

ALP: alkaline phosphatase

Col I: type I collagen

ON: osteonectin

### III. 실험 결과

#### 1. 상아질모세포 분화과정에서 분화 특이유전자들의 발현에 미치는 키토산의 효과

생쥐 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주에 ascorbic acid와  $\beta$ -glycerophosphate를 첨가하여 석회화 결절의 형성을 유도한 배양과정에서 키토산의 효과를 분석하기 위해, MDPC-23 세포주 분화과정에서 키토산 10 $\mu$ M을 처리한 후 ALP, Col I 및 ON 각각의 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR 을 시행하였다.

ALP mRNA의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 점차 증가하였다 (Fig. 1). 대조군에서는 배양 0일과 4일째까지 ALP의 발현을 관찰할 수 없었으나, 7일 째부터 GAPDH 대비 2.1%의 발현을 보이기 시작하여 10일째에서는 13.3%, 14일째에서는 19.5%의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 키토산 처리군에서는 배양 0일째에는 ALP의 발현을 관찰할 수 없었으나, 4일째부터 GAPDH 대비 1.1%의 발현을 보이기 시작하여 7일째에서는 11.1%, 10일째에서는 26.5%, 14일째에서는 27.6%의 발현을 관찰 할 수 있었으며, 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 ALP mRNA의 발현을 증가시키면서 가속화시킴을 알 수 있었다(Fig. 1).

Col I mRNA의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 점차 감소하였다 (Fig. 2). 대조군에서 Col I은 배양 0일째 GAPDH 대비 46.1%의 발현을 보였으며, 4일 째에서 46.2%, 7일째에서는 32.9%, 10일째에서는 22.2%, 14일째에서는 2.9%로 발현이 점차 감소하였다(Fig. 2). 키토산 처리군에서 Col I은 배양 4일째 GAPDH 대비 46.5% 의 발현을 보였고, 7일째에서 33.0%, 10일째에서는 0.9%, 14일째에서는 0.1%로 발현이

점차 감소하였으며, 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 Col I mRNA의 발현감소를 가속화시킴을 알 수 있었다(Fig. 2).

본 연구에서 MDPC-23 세포주에서 분화를 유도한 후 시간이 경과함에 따라 ON mRNA의 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 대조군에서 ON은 배양 0일째 GAPDH 대비 9.6%의 발현을 보였으며, 4일째에서 7.9%, 7일째에서는 6.1%, 10일째에서는 0.7%, 14일째에서는 0.3%로 발현이 점차 감소하였다(Fig. 3). 키토산 처리군에서 ON은 배양 4일째 GAPDH 대비 9.0%의 발현을 보였고, 7일째에서 3.9%, 10일째와 14일째에서는 0.1%로 발현이 점차 감소하였으며, 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 ON mRNA의 발현감소를 가속화시킴을 알 수 있었다(Fig. 3).

## 2. 상아질모세포 분화과정에서 세포형태의 변화에 미치는 키토산의 효과

상아질모세포의 분화과정에서 세포형태의 변화를 관찰하였다. 배양접시의 바닥에 MDPC-23 세포가 80-90% 정도 채워져 있을 때, ascorbic acid와  $\beta$ -glycerophosphate를 첨가하여 석회화 결절 유도를 시작하였다(Fig. 4, 배양 0일).

대조군에서는 배양 4일째에 세포밀도의 증가와 함께 세포형태의 변화가 관찰되었다(Fig. 4). 배양 7일째에는 여러 층의 세포와 결절들이 관찰되었으며, 특히 배양 4일과 7일 사이에 세포의 증식이 급격히 증가하여 고밀도의 세포와 흰 결절들이 관찰되기 시작하였다(Fig. 4). 배양 10일째에는 배양 7일째부터 관찰되던 흰 결절들의 크기가 증가하는 것을 보였으며, 배양 14일째에는 흰 결절들의 밀도가 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4). 배양 7일에서 14일까지의 기간에서 흰 결절들이 육안으로 확인되었으며, 이 시기의 세포형태는 배양 초기의 세포형태와 많은 차이가 있었다.

키토산을 처리한 실험군에서는 배양 4일째에 세포밀도의 증가와 함께 세포형태의 변화가 관찰되었으며, 특히 배양 0일과 4일 사이에 세포의 증식이 급격히 증가하여 고밀도의 세포와 흰 결절들이 관찰되기 시작하였다(Fig. 4). 배양 7일째에는 여러 층의 세포와 결절들이 관찰되었으며, 배양 10일째와 14일째로 시간이 경과함에 따라 흰 결절들의 밀도가 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4). 배양 4일에서부터 흰 결절들이 육안으로 확인되었으며, 세포형태는 배양초기의 세포형태와 많은 차이가 있었다.

### 3. 상아질모세포 분화과정에서 석회화 결절형성에 미치는 키토산의 효과

상아질모세포 분화과정에서 석회화 결절형성에 미치는 키토산의 효과를 확인하기 위하여, MDPC-23 세포주 분화과정에서 키토산 10 $\mu$ M을 처리한 후, Alizaline red-S 염색을 시행하였다. 배양 4일째에서는 대조군에 비해 키토산 처리군에서 석회화 결절 정도가 약간 증가하는 경향을 보였으나 뚜렷한 차이는 없었다(Fig. 5). 그러나 배양 7일째부터 시간이 경과할수록 대조군에 비해 키토산 처리군에서 석회화 결절의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었으며, 특히 배양 7일째와 10일째의 경우 대조군과 키토산 처리군에서 가장 차이가 있었다(Fig. 5).

## IV. 총괄 및 고안

상아질모세포의 분화과정은 다양한 세포기질분자, 신호전달물질, 성장인자 및 여러 수용체들이 관여하는 고도로 조직화된 과정이다<sup>29-31)</sup>. 상아질모세포의 분화에 관련된 인자들로는 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )<sup>32)</sup>나 dentin matrix protein 1(DMP1)<sup>33,34)</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>35)</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.

키토산이 가지고 있는 다양한 생물학적 기능으로 인하여 키토산 관련 연구가 의학 및 치의학 영역에서 활발하게 진행되고 있다<sup>13-19)</sup>. 또한 키토산을 수산화인회석이나 삼인산칼슘(tricalcium phosphate) 등과 혼합한 형태나 3차원적 열개형태로 골 유도물질의 전달자 역할을 하거나 혹은 그 자체가 골전도를 하는 역할에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다<sup>20,21)</sup>. 그러나 키토산의 직접적인 골유도 여부에 관해서는 아직 알려져 있지 않으며, 치아형성 과정에서 키토산의 생물학적 기능은 더욱 밝혀지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 상아질모세포의 분화과정에서 키토산의 효과을 밝히기 위해, 생쥐 치유두세포 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주에서 분화유도와

키토산을 처리한 후, MDPC-23 세포주의 특성변화를 분석하였다.

본 연구에서 MDPC-23 세포주의 분화를 유도한 후 ALP mRNA의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정 초기에는 관찰할 수 없었으나 배양시간이 경과하면서 점차 증가하였다(Fig. 1). 대조군에서는 배양 0일과 4일째까지 ALP의 발현을 관찰할 수 없었으나, 7일째부터 발현을 보이기 시작하여 배양시간이 경과하면서 점차 증가하였다. 이 결과는 치주인대섬유모세포의 분화유도 과정에서 ALP mRNA 발현이 배양초기에는 관찰되지 않았으나 배양시간이 경과할수록 점차 증가한다는 Foster 등 (2006)<sup>36)</sup>의 연구결과와 유사하였다. 키토산 처리군에서는 배양 0일째에는 ALP의 발현을 관찰할 수 없었으나, 4일째부터 발현을 보이기 시작하여 배양시간이 경과하면서 점차 증가하였으며, ALP의 발현이 대조군에 비해 더욱 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 ALP의 발현을 증가시키면서 가속화시킴을 알 수 있었으며, 이는 키토산이 상아질모세포의 분화를 촉진시킬 수 있음을 시사한다.

Col I mRNA의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 점차 감소하였다 (Fig. 2). 대조군에서 Col I 은 배양 0일째 GAPDH 대비 46.1%의 발현을 보였으며, 배양시간이 경과하면서 점차 감소하였다. 이 결과는 치주인대섬유모세포의 분화유도 과정에서 Col I mRNA 발현이 배양시간이 경과할수록 점차 감소한다는 Foster 등 (2006)<sup>36)</sup>의 연구결과와 유사하였다. 키토산 처리군에서 Col I 은 배양 4일째 GAPDH 대비 46.5%의 발현을 보였고 배양시간이 경과하면서 점차 감소하였으며, Col I 의 발현이 대조군에 비해 더욱 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 Col I 의 발현감소를 가속화시킴을 알 수 있었으며, 이는 키토산이 상아질모세포의 분화를 촉진시킬 수 있음을 시사한다.

본 연구에서 MDPC-23 세포주에서 분화를 유도한 후 시간이 경과함에 따라 ON mRNA의 발현은 감소하였다(Fig. 3). 대조군에서 ON은 배양 0일째 GAPDH 대비

9.6%의 발현을 보였으며, 배양시간이 경과하면서 점차 감소하였다. 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>37)</sup>의 연구결과와 일치한다. 키토산 처리군에서 ON은 배양 4일째 GAPDH 대비 9.0%의 발현을 보였고, 배양시간이 경과하면서 점차 감소하였으며, ON의 발현이 대조군에 비해 더욱 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 ON의 발현감소를 가속화시킴을 알 수 있었으며, 이는 키토산이 상아질모세포의 분화를 촉진시킬 수 있음을 시사한다.

한편, 본 연구에서 분화 중인 MDPC-23 세포주의 형태학적인 관찰(Fig. 4)과 석회화 결절형성을 육안으로 확인하기 위해 Alizaline red-S 염색(Fig. 5)을 시행하였다. 분화유도 초기에서는 대조군에 비해 키토산 처리군에서 석회화 결절정도가 약간 증가하는 경향을 보였으나, 배양 7일째부터 시간이 경과할수록 대조군에 비해 키토산 처리군에서 석회화 결절의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과는 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산이 상아질모세포의 분화를 직접적으로 촉진시킬 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 치아형성 과정에서 상아질모세포 분화의 분자적인 기전과 키토산의 효과에 대한 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주 분화과정에서 키토산이 상아질모세포 분화를 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 본 실험의 결과로, 상아질 수복과 재생에 관한 하나의 연구방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

상아질모세포의 분화과정에서 키토산에 의한 상아질모세포의 특성변화를 분석하여, 상아질 재생 유도물질 개발의 토대를 제공하기 위해, 생쥐 치유두세포 유래의 상아질 세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주에서 분화유도와 키토산을 처리한 후, RT-PCR 분석, 세포형태 관찰 및 Alizaline red-S 염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 ALP의 발현을 증가시키면서 가속화시켰다.
2. MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 Col I의 발현감소를 가속화시켰다.
3. MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 키토산은 ON의 발현감소를 가속화시켰다.
4. MDPC-23 세포주의 분화유도 초기에서 대조군에 비해 키토산 처리군에서 석회화 결절정도가 약간 증가하였으며, 시간이 경과할수록 대조군에 비해 키토산 처리군에서 석회화 결절현상이 뚜렷하였다.

본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주 분화과정에서 키토산이 상아질모세포의 분화를 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 본 실험의 결과로, 상아질 수복과 재생에 관한 하나의 연구방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

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, Loriot 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. Schipper NGM, Varum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res* 1996;13:1686–1692.
8. Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, deBoer AG, Varum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res* 1997;14:923–929.
9. Schipper NGM, Varum KM, Stenberg P, Ocklind G, Lennernas H, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur J Pharm Sci* 1999;8:335–343.
10. Ranaldi G, Marigliano I, Vespignani I, Perozzi G, Sambuy Y. The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. *J Nutr Biochem* 2002;13:157–167.
11. Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm* 1999;182:21–32.
12. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 1998;15:1326–1331.
13. Porporatto C, Bianco ID, Riera CM, Correa SG. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:266–272.

14. Peluso G, Petillo O, Tanieri M, Santin M, Ambrosic L, Calabro D, et. al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 1994;15:1215–1220.
15. Hirano S. Chitin biotechnology applications. *Biotechnol Annu Rev* 1996;2:237–258.
16. Ormrod DJ, Holmes CC, Miller TE. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;138:329–334.
17. Gallaher CM, Munion J, Hesslink Jr R, Wise J, Gallaher DD. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr* 2000;130:2753–2759.
18. Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, SuzukiS, Suzuki M. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexanose and chitohexanose against Meth-A solid tumor. *Chem Pharm Bull* 1988;86:784–790.
19. Pae HO, Seo WG, Kim NY, Oh GS, Kim GE, Kim YH, et. al. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leuk Res* 2001;25:339–346.
20. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, et. al. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol* 2000;71:410–417.

21. Finisie MR, Josue A, Favere VT, Laranjeira MC. Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration. An Acad Brad Cienc 2001;73:525–532.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Nam JP, Kim DG, Jeong YI, Jang MK, Nah JW. Preparation and NMR spectroscopic characterization of low molecular water soluble N,O-carboxymethyl chitosan. J Chitin Chitosan 2007;12:151–155.
27. Jang MJ, Seo DH, Jang HS, Park JK, Kim DG, Choi C, et. al. Characterization of chitosan-DNA complex for application as a gene carrier. J Chitin Chitosan 2006;11:175–179.

28. 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.
29. Tziaras 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.
30. 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.
31. 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.
32. Tziaras 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.
33. Gronthos S, Mankani M, Brahim 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.
34. 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.

35. 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.
36. 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.
37. 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.

## VII. 사진부도 설명

Fig. 1. Effect of chitosan on alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression.

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 (ALP; 430 bp, GAPDH; 349 bp) (0; 0 day after treatment with differentiation media, 4; 4 days after treatment with differentiation media, 7; 7 days after treatment with differentiation media, 10; 10 days after treatment with differentiation media, 14; 14 days after treatment with differentiation media, Control; treatment with differentiation media only, Chitosan; treatment with differentiation media and chitosan) *B.* The percentage of ALP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Fig. 2. Effect of chitosan on type I collagen (Col I ) mRNA expression.

*A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells (Col I ; 411 bp, GAPDH; 349 bp) *B.* The percentage of Col I mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Other legends are the same as in Fig. 1.

Fig. 3. Effect of chitosan on osteonectin (ON) mRNA expression.

*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. 4. Change of cell morphology in MDPC-23 cells.

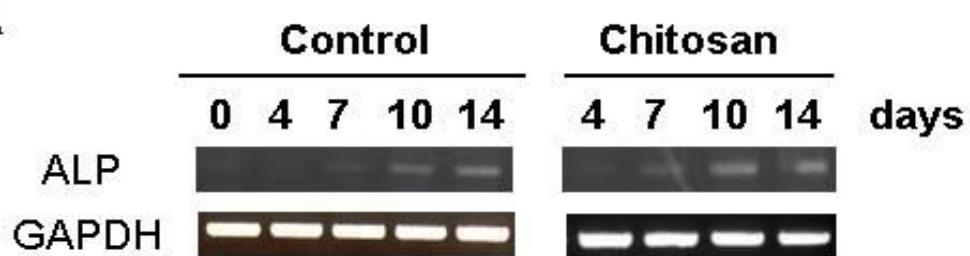
Differentiation pattern of MDPC-23 cells in the differentiation media and chitosan was examined after 0, 4, 7, 10 and 14 days of culture. The change of cell morphology during differentiation of MDPC-23 cells was investigated to inverted microscope 200 X or 400 X.

Fig. 5. Mineralized nodule formation in MDPC-23 cells.

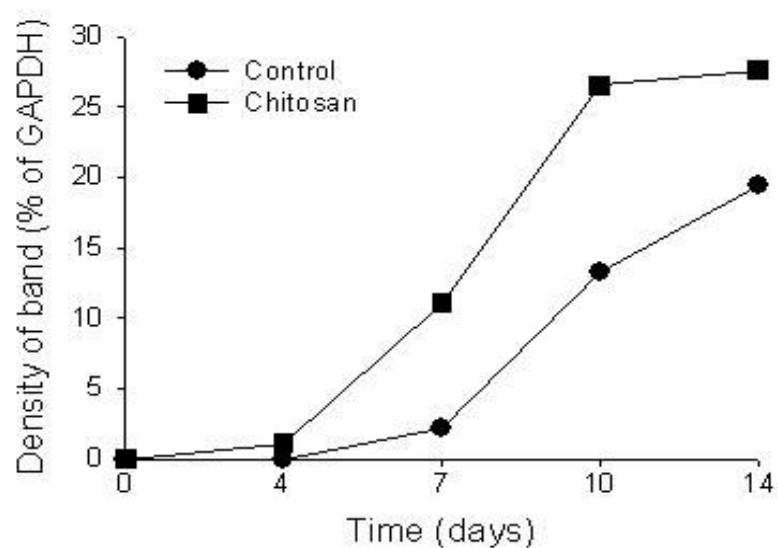
The mineralized nodule formation induced by the differentiation media and chitosan was examined after 0, 4, 7, 10 and 14 days of culture. The cells were grown in the presence of ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate for inducing the mineralization and were examined the effect of chitosan on mineralized nodule formation. The nodules were detected by Alizaline red-S staining.

### VII. 박주현 사진부도(Fig. 1)

A



B

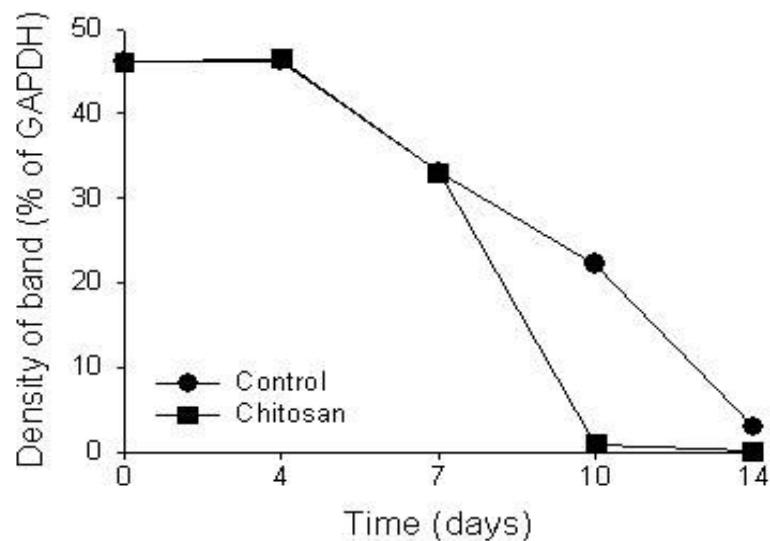


### VIII. 박주현 사진부도(Fig. 2)

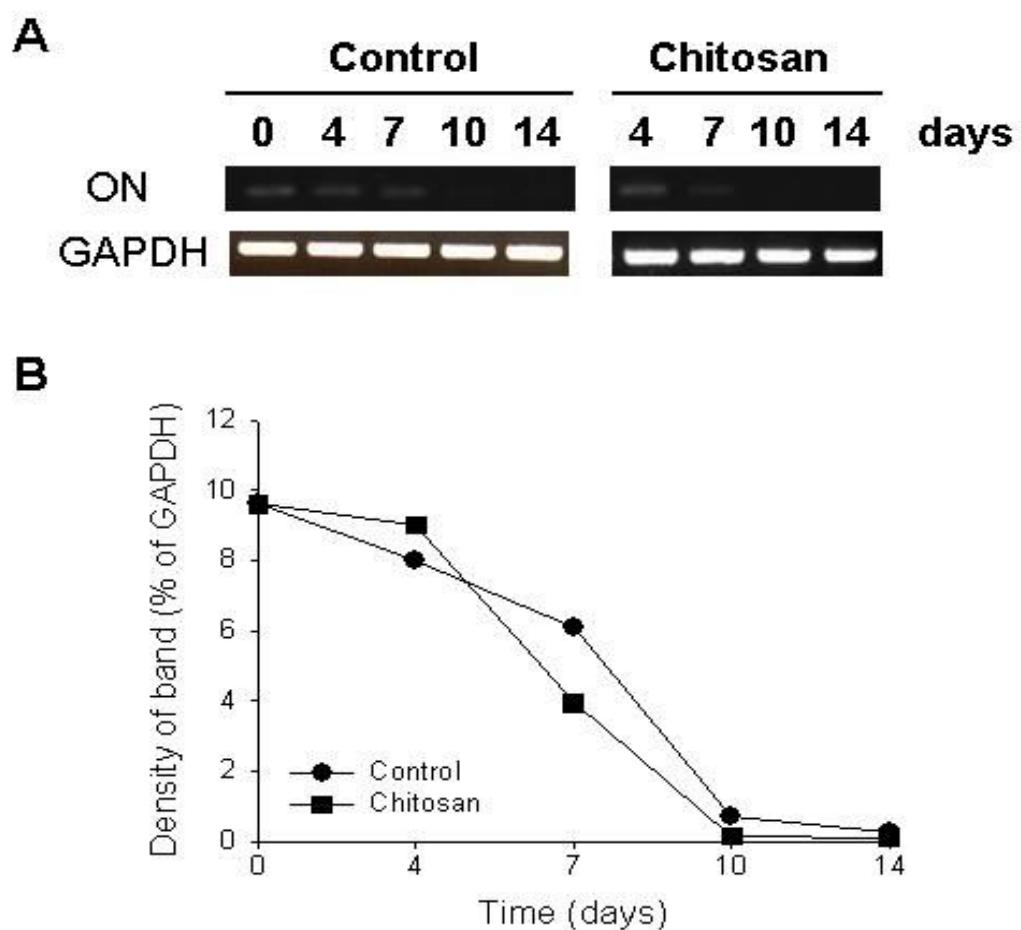
A



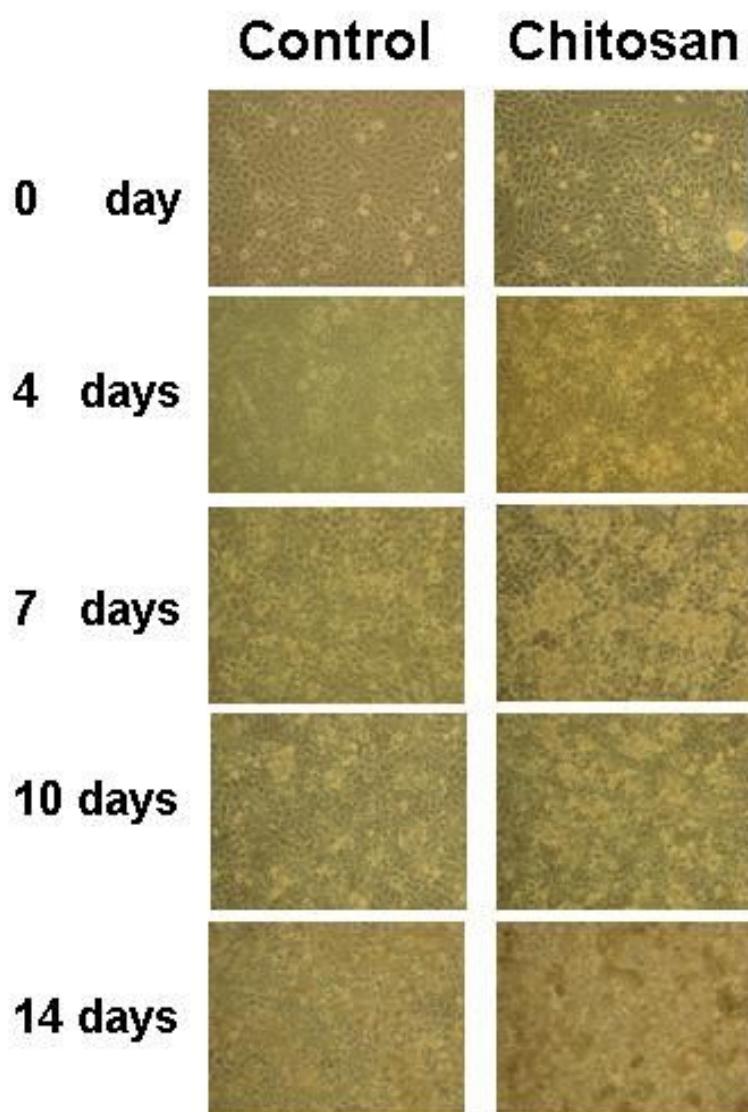
B



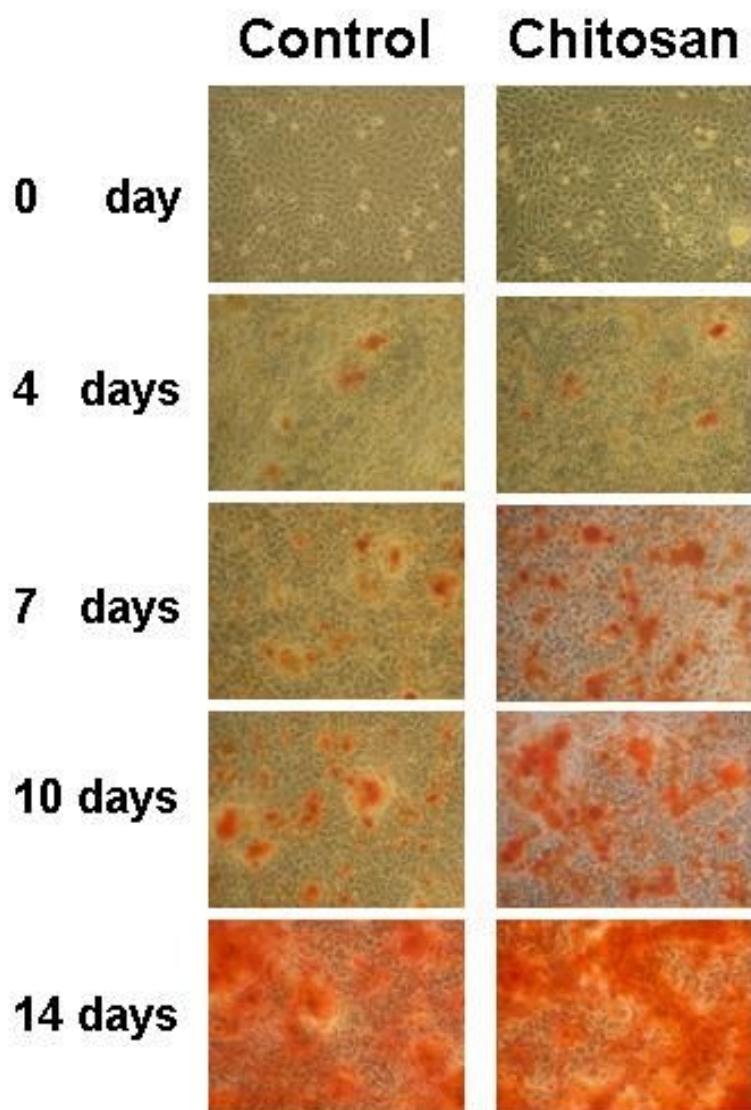
### VIII. 박주현 사진부도(Fig. 3)



VII. 박주현 사진부도(Fig. 4)



VII. 박주현 사진부도(Fig. 5)



## 저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20087246	과 정	석사
성 명	한글: 박 주 현 영문: Park, Ju-Hyun				
주 소	(463-929) 경기도 성남시 분당구 야탑동 탑마을 진덕아파트 509동 1102호				
연락처	E-MAIL: dreamdent@korea.com				
논문제목	한글: 배양 상아질모세포 분화에 미치는 키토산의 효과 영문: Effect of chitosan on cultured odontoblast differentiation				

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

- 다 음 -

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

동의여부 : 동의( O ) 반대( )

2010년 8월 일

저작자: 박 주 현 (서명 또는 인)

**조선대학교 총장 귀하**