

상아모세포의 조건배지를 이용한 백악모세포의 분화와 석회화 조절

문상원¹, 김예선¹, 송연정¹, 식용규¹, 박종태¹, 김용중², 장연선², 박주철^{1,2,*}

¹조선대학교 치과대학 구강조직학 교실

²조선대학교 치과대학 구강생물학연구소

I. 서 론

백악질은 치근 표면을 덮고 있는 석회화된 결합조직이다. 이는 치주인대와 치근사이의 상호관계를 조절한다^{1,2)}. 치주조직의 재생 과정에서는 치근표면에 결합조직 섬유질의 새로운 부착이 이루어져야 하므로 치근에서 백악질의 형성이 재생과정에서 중요한 역할을 한다. 백악질 형성과정(cementogenesis)은 크게 두 가지 방법이 알려져 있다. 첫째는 Hertwig epithelial root sheath (HERS)와 상아질로부터 온 유도신호의 상호작용에 의한 것이다³⁾. 치근 발생의 시작은 HERS가 치수세포 방향으로 법랑질 단백질과 같은 물질을 분비함으로써 유도신호를 보내어 외배엽성중간엽 세포가 상피-간엽 상호작용으로 상아모세포로 분화한다. 상아모세포가 전상아질(predentin)을 형성한 직후 HERS에 구멍이 나면 치아주머니의 안쪽 부분에 있던 외배엽성중간엽 세포가 구멍이 난 사이로 들어와 전상아질과 접촉하고 치근표면에 백

악질을 형성하기 시작한다⁴⁾. 둘째는 HERS의 세포가 백악모세포로 직접 전환(transformation)한다는 것이다⁵⁻⁹⁾. 현재는 백악-법랑경계 근처에서 나타나는 무세포 무섬유 백악질이 치주인대와 아무런 상관이 없고 치아부착에 특별히 관여하지 않으므로 HERS의 세포가 직접 전환되어 생성한 것으로 추정된다. 그러나 백악질 형성과정에서 상아질의 역할에 관해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

현재까지의 연구는 백악모세포의 분화개시 인자를 찾고 그 기원이 어디인지 밝혀내는 것에 초점이 맞추어져 있었다. 하지만 이 연구는 분화의 개시가 아닌 축진의 측면에서 백악모세포의 분화를 살펴보았다. 치아 구성요소 중 상아질은 백악질의 발생 과정, 발생 기원 그리고 해부학적 위치에서 서로 관련성이 있다. 따라서 이 실험은 세 가지 관련성을 토대로 상아질이 백악질의 분화에 영향을 끼치는 요소일 것이라는 논리적 근거를 토대로 진행되었다. 첫째, 무세포 백악질/세포 백악질 모두 상아질 표면이 무기질

* 본 연구는 교육인적자원부 누리사업 국고보조금으로 수행한 과제임

* Corresponding author : Joo-Cheol Park, Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University, 421 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju, Korea, 우편번호 : 501-759, Tel : 82-62-230-6874, Fax : 82-62-224-3706
E-mail : jcapark@chosun.ac.kr

침착되기 전에 침착이 진행되는 것으로 보아 전상아질이 백악모세포의 분화에 영향을 준다고 추정해 볼 수 있다. 둘째, 치아를 해부학적으로 살펴보면 치근에서 상아질과 백악질은 매우 인접해 있다. 그러므로 서로간의 상호작용이 있을 가능성은 다른 조직에서보다 열려있을 것이다. 셋째, 상아모세포와 백악모세포는 같은 외배엽성중간엽 기원의 세포이므로 기원이 다른 세포들 보다는 상아모세포가 백악모세포의 분화에 영향을 미칠 가능성이 더 클 것이다. 또한 최근에는 발생학적으로 세포의 기원이 유사한 경우의 예에서, 즉 같은 신경성 상피 기원인 상아질 기질 단백질(dentin matrix protein)을 척추 유래의 신경성 상피세포 전구세포에 준 경우 현저한 형태학적 변화나 유전자 발현의 변화가 나타난다고 하였다.

이 연구에서는 치아의 해부학적 위치를 고려하여 백악모세포에 영향을 줄 수 있는 세포주(상아모세포(odontoblast)주로는 MDPC-23과 OD11을, 법랑모세포(ameloblast)로는 Akita Medical School(일본)의 법랑모세포주, 섬유모세포(fibroblast)주로는 NIH3T3, 골모세포(osteoblast)주로는 MG63, 주 배양세포인 백악모세포의 세포주(cell line)로는 OCCM30¹⁰⁾를 이용하여, 백악모세포의 분화와 석회화에 영향을 미치는 세포들을 알아보려고 하였다. 또한 백악모세포(cementoblast)와 각 세포주사이의 상호작용을 알아보기 위하여 조건배지(conditioned

media)를 이용하여 세포를 배양한 후, 광학현미경을 통하여 세포를 형태학적으로 관찰하고, Alizarin red-S 염색법¹¹⁾을 통하여 석회화 결절 유무를 평가하였고, 유전자 발현을 RT-PCR방법¹²⁾을 통해서 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양 및 조건배지의 transfer

1) 세포의 배양

OCCM30은 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제(Penicillin 100U/ml, Streptomycin 100 μ g/ml, Gentamycin 50 μ g/ml 및 fungizone 2.5 μ g/ml)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, Rockville, USA)에 세포의 분화와 석회화를 유도하기 위하여 ascorbic acid(50 μ g/ml)와 β -glycerophosphate(10mM)을 첨가하였다. NIH3T3, MDPC23, OD11은 위와 동일한 배지에서 배양하였고 법랑모세포주와 MG63은 DMEM대신 α -MEM을 사용하였고 법랑모세포주에는 성장인자인 EGF(Epithelial Growth Factor, 50ng/ml)를 배양액에 첨가하여 사용하였다.

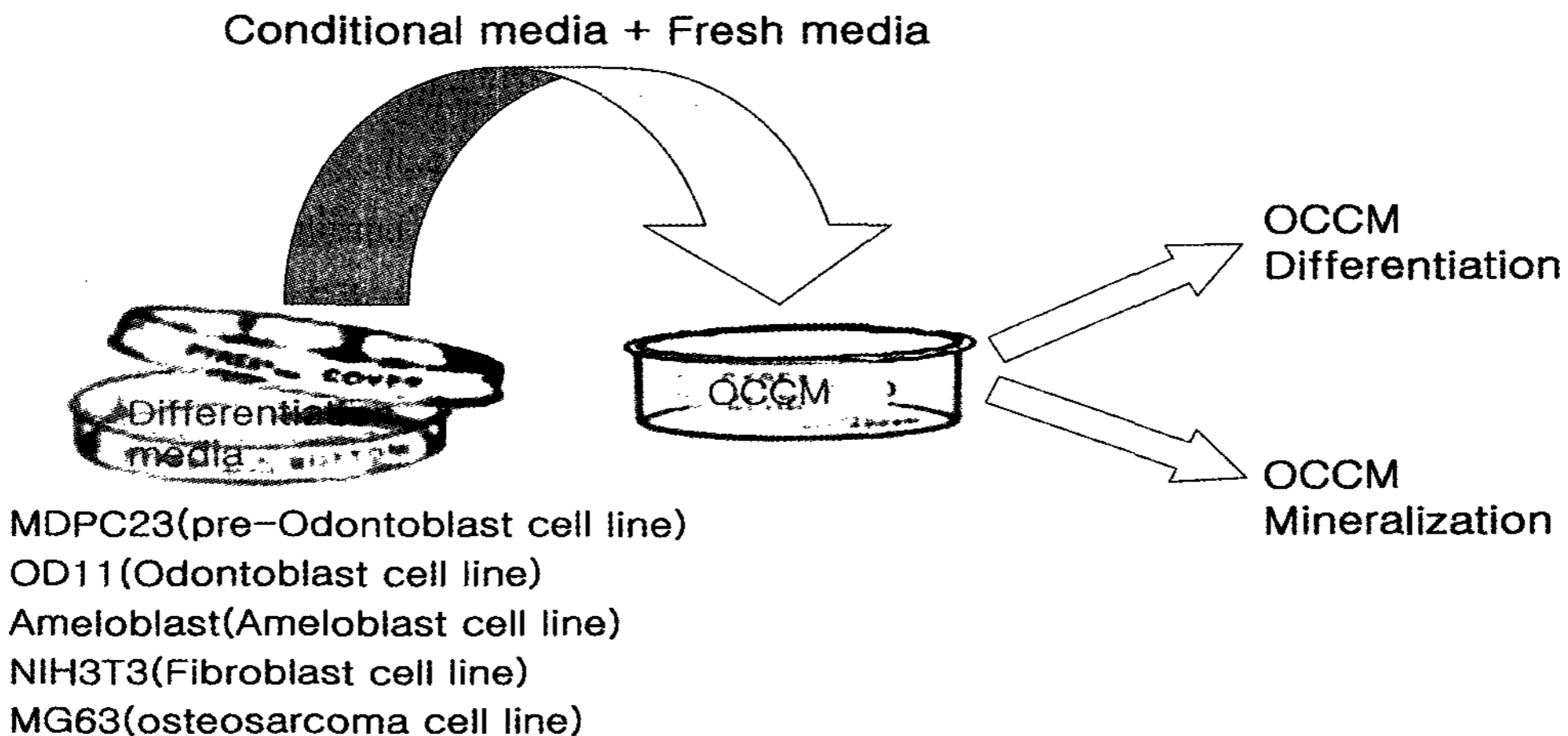


Figure 1. transfer of conditioned media

2) 조건배지의 transfer

각 세포주의 분비물질이 OCCM30의 분화 및 석회화에 미치는 영향을 알기 위하여 조건배지의 transfer를 시행하였다(Figure 1). NIH3T3, Ameloblast, MDPC23, OD11, MG63을 각각 배양하고, 이들이 분비한 물질을 함유하고 있는 배지(조건배지)를 OCCM30에 옮겨주었다. 조건배지로 배양되는 백악모세포를 각각 NIH3T3-OCCM30, Ameloblast-OCCM30, MDPC23-OCCM30, OD11-OCCM30, MG63-OCCM30로 설정하고 대조군으로 control-OCCM30을 배양하였다.

배지 교체는 NIH3T3, Ameloblast, MDPC23, OD11, MG63의 경우는 하루에 두 번 6시간 간격으로 해주었다. 6시간정도이면 각 세포가 백악모세포에 영향을 주는 물질을 분비하기에 충분한 시간이다. 6시간이 지난 후, 조건배지를 신선한 분화 배지와 1:1의 비율로 하루에 한 번 OCCM30에 넣어주었다. control-OCCM30은 신선한 분화배지로 하루에 한번 교체하였다.

2. 조건배지에서 백악모세포 분화 및 석회화 평가

조건배지를 넣어준 백악모세포를 배양 0일, 4일, 7일, 10일, 14일 후에 분화 및 석회화의 정도를 다음

과 같이 평가하였다.

1) 세포의 형태학적 관찰

세포를 배양하는 동안 0, 4, 7, 10, 14일마다 독립현미경으로 세포의 모양, 배열 및 분화 양상을 형태학적으로 관찰하였다.

2) 석회화 결절의 확인

조건배지로 각각 배양한 것과 control-OCCM30을 0일, 4일, 7일, 10일, 14일 후에 1×PBS로 3회 세척하고 70% ethanol로 20분간 고정한 다음 0.1% NH₄OH가 함유된 1% Alizarin Red-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 용액으로 염색하여 석회화 결절을 확인하였다¹¹⁾.

3) 총 RNA 추출 및 RT-PCR 분석

조건배지를 준 백악모세포를 배양 0, 4, 7, 10, 14일 후 Trizol reagent (Invitrogen life tech, califonia, USA)로 total RNA를 추출하였다¹²⁾. RT premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하고 bone sialoprotein(BSP), alkaline phosphatase(ALP), osteocalcin(OC), type I collagen(Col I), osteonectin(SPARC;secreted protein acidic and rich in cystein) 및 GAPDH 특이적 primer를 이용하여

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR

Matrix protein		Primer sequence (5'-3')	size (bp)
ALP	Sense	ctctccgagatggtggaggt	450
	Antisense	gtcttctccaccgtgggtct	
BSP	Sense	aagaaaatggagacggcgat	453
	Antisense	cacctgcttcagtgcgctt	
OC	Sense	ccacagccttcatgtccaag	489
	Antisense	ggcagagagagaggacaggg	
SPARC	Sense	taagctcaccgtccacaagc	461
	Antisense	ctttcctgaaacagcctccc	
Type I collagen	Sense	taagtgccaagaacgtgcc	494
	Antisense	aattgaaagccaggaggcat	
GAPDH	Sense	accacagtccatgccatcac	452
	Antisense	tccaccacctgttctgtgt	

Table 2. Condition of RT-PCR

matrix protein	RT-PCR 순서
ALP	(94°C/5분 → 94°C/45초 → 62°C/1분 → 72°C/45초) : 35cycle → 72°C/10분
BSP	(94°C/12분 → 94°C/30초 → 49.1°C/1분 → 72°C/30초) : 35cycle → 72°C/10분
SPARC	(94°C/5분 → 94°C/30초 → 59.9°C/1분 → 72°C/30초) : 35cycle → 72°C/10분
Type I collagen	(94°C/5분 → 94°C/45초 → 55°C/1분 → 72°C/45초) : 30cycle → 72°C/10분
OC	(94°C/5분 → 94°C/30초 → 63.5°C/1분 → 72°C/30초) : 35cycle → 72°C/10분

PCR을 시행하였다(Table 1). PCR의 온도와 시간, cycle은 유전자별로 각각 적용하였고(Table 2), PCR 생성물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 유전자 발현을 확인하였다.

III. 결 과

1. 백악모세포의 형태학적 변화

조건배지를 준 백악모세포는 3-4일 경까지 공통적으로 세포가 공간을 가득 채우며 증가하였다. 그

런데, 4~5일 경부터 MDPC23-OCCM30과 OD11-OCCM30 세포주에서만 백악모세포가 한 지점으로 모여드는 양상을 보였다. 5-7일 경에는 이들 세포주에서 석회화 결절이 생성되기 시작하는 것을 관찰하였다(Figure 2, Table 3). 석회화 결절 형성 정도는 분화단계에 따라 점차 증가하였다. 그러나 그 외 control OCCM30, NIH-OCCM30, Ameloblast-OCCM30, MG63-OCCM30 세포주들은 14일의 배양 기간 동안 특징적 변화 없이 분화하였으며, 석회화 결절도 보이지 않았다.

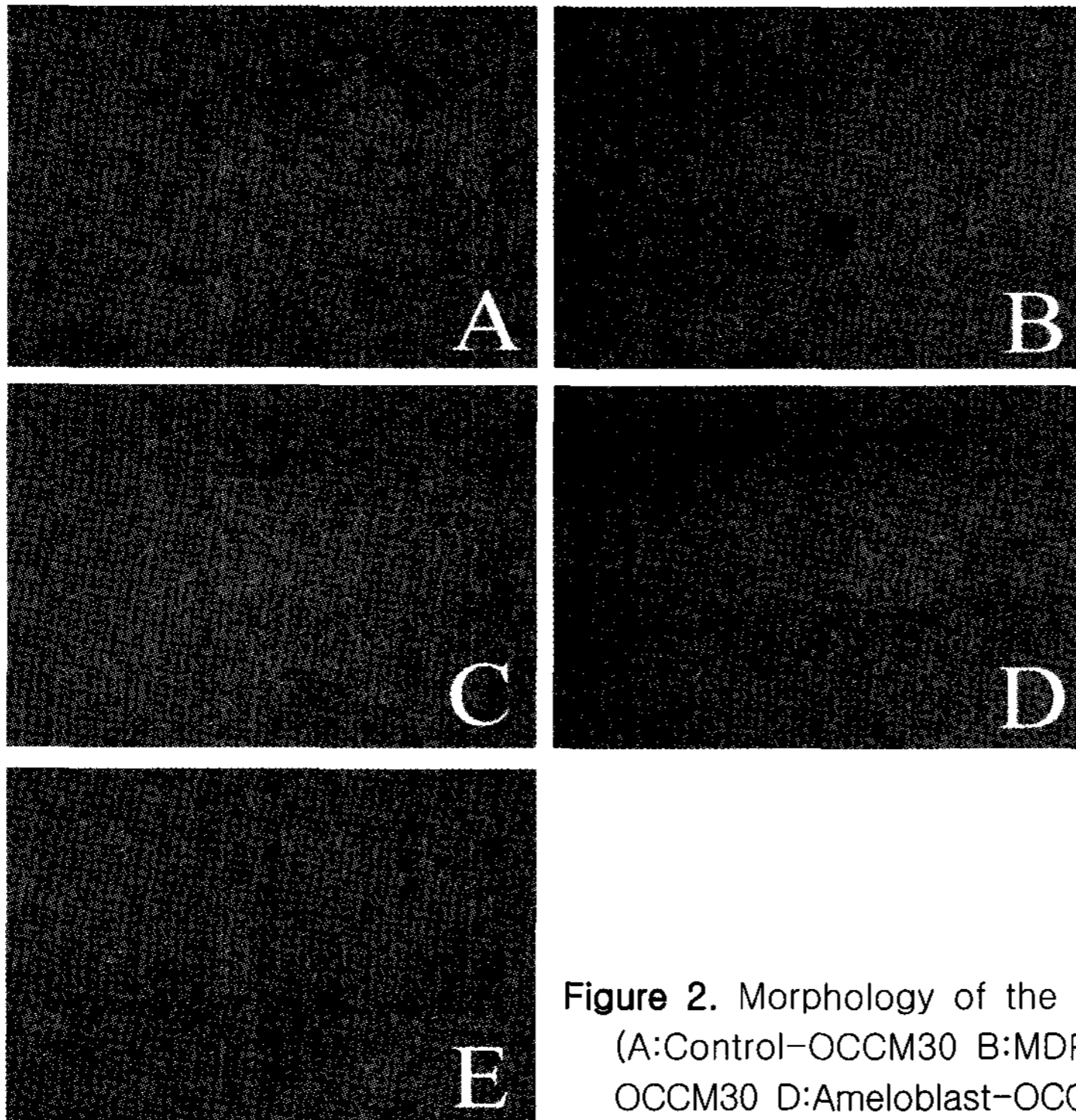


Figure 2. Morphology of the cells after 7 days culture (A:Control-OCCM30 B:MDPC23-OCCM30 C: OD11-OCCM30 D:Ameloblast-OCCM30 E: NIH3T3-OCCM30).

Table 3. Calcified nodule formation in OCCM-30 cells according to the application of various conditioned media

	Control	MDPC23	OD11	NIH3T3	Ameloblast
0일	-	-	-	-	-
4일	-	+	+	-	-
7일	-	+	+	-	-
10일	-	++	++	-	-
14일	+	++	++	+	+

-: negative, +: positive, ++: strong positive

2. Alizarin Red-S 염색 결과 분석

Alizarin red-S염색을 통하여 각 세포주별 석회화 결절 형성 여부를 관찰하였다. 대조군 OCCM-30은 배양 14일 전까지는 붉게 염색된 석회화 결절이 보이지 않았다. 그 외 NIH3T3, Ameloblast, MG63에서 분비한 조건배지를 준 OCCM-30에서도 역시

배양 14일까지 석회화 결절을 나타내지 않았다. 특히 하계도 MDPC-23과 OD-11의 조건배지를 받은 OCCM-30만이 배양 4일부터 붉게 염색된 석회화 결절이 관찰되기 시작하였다(Figure 3). 이들 석회화 결절은 분화단계가 진행될수록 그 수가 많아지고, 진행되는 양상을 보였다.

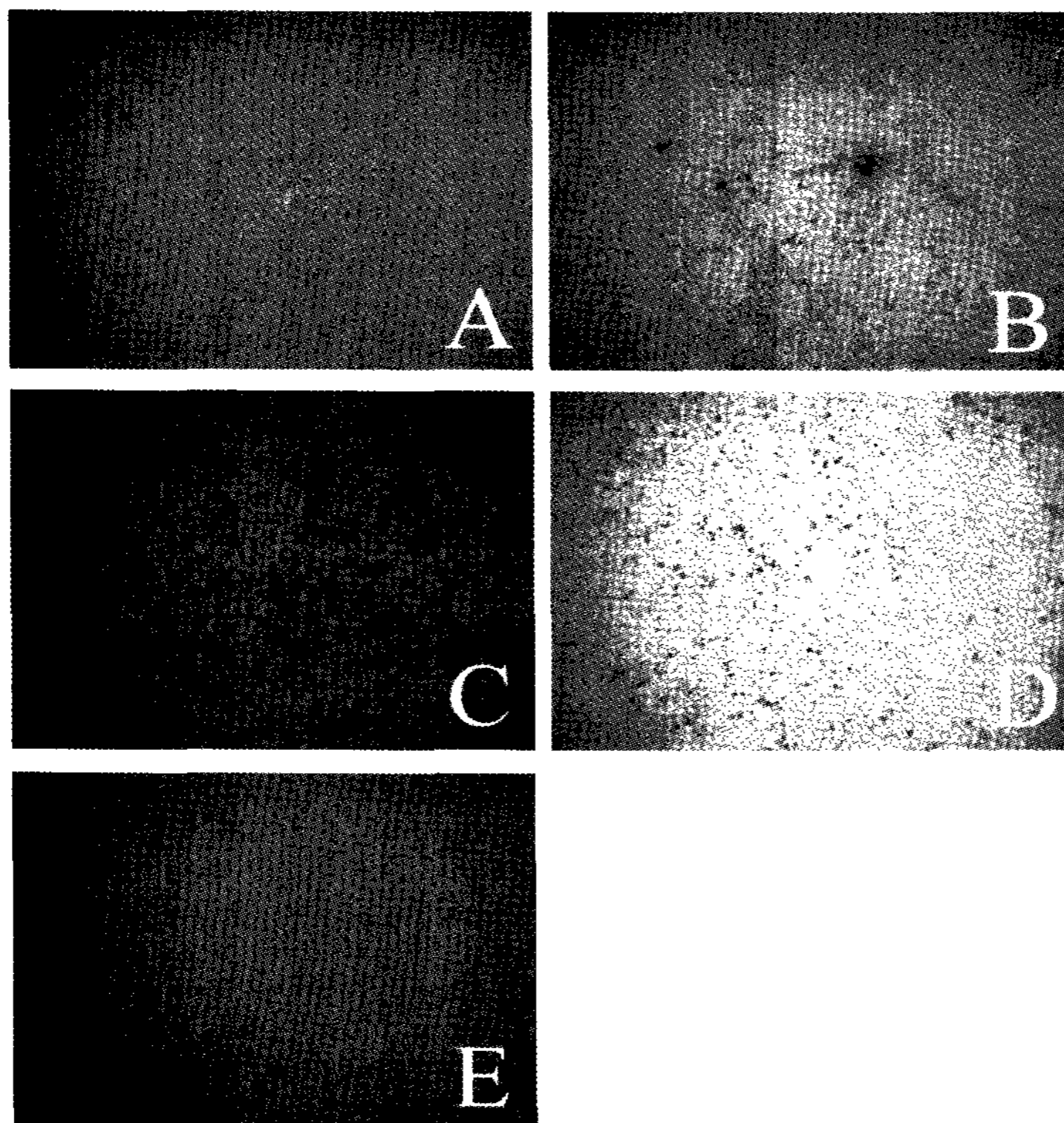


Figure 3. Alizarin red-S staining of the cells after 4 days culture

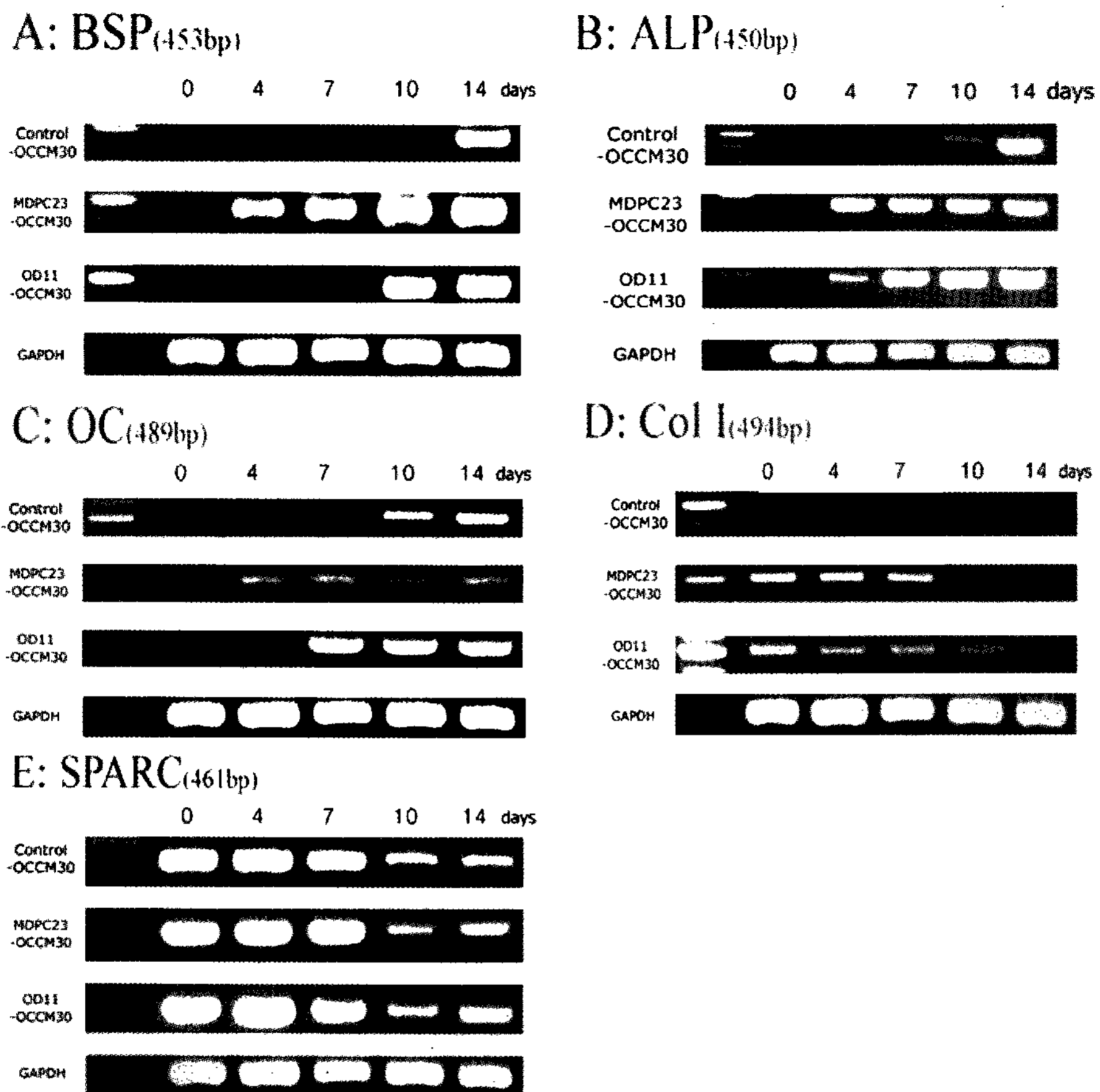


Figure. 4 Expression of BSP (A), ALP (B), OC (C), Col I (D) and SPARC (E) mRNAs during the culture analysed by RT-PCR.

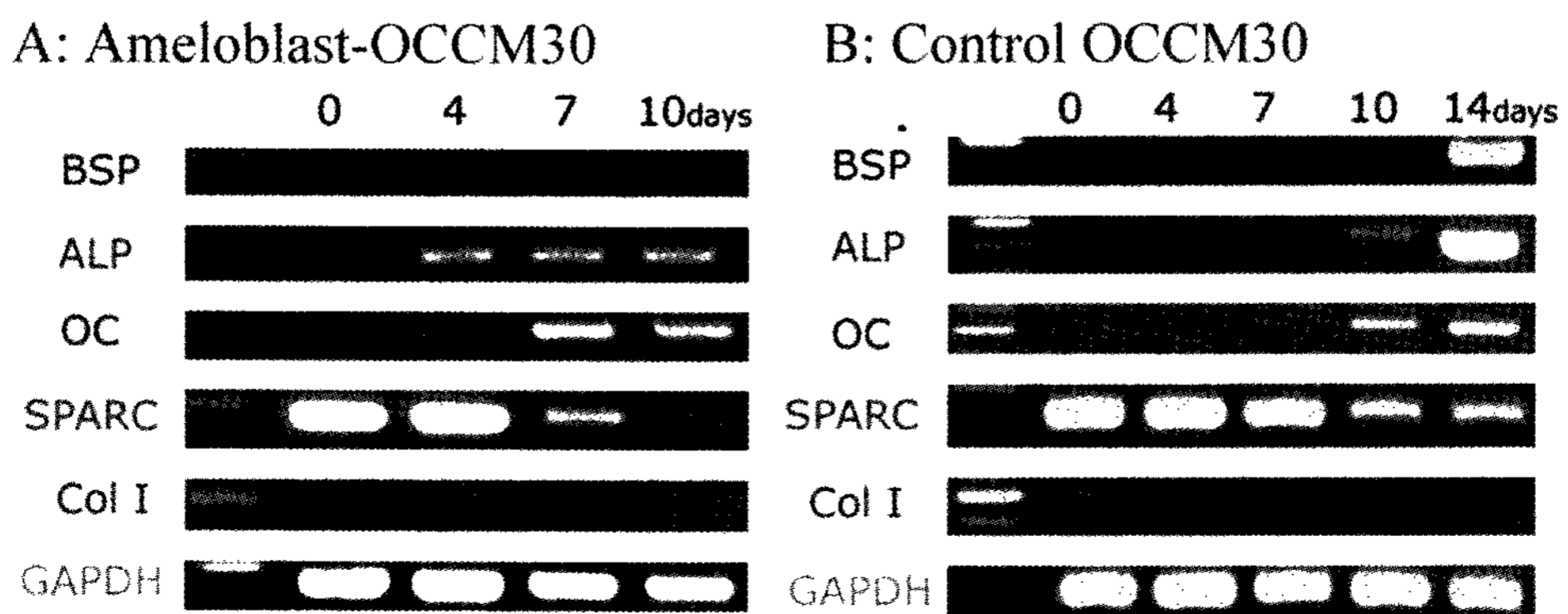


Figure. 5 Comparison of mRNAs expression between Ameloblast-OCCM30(A) and Control OCCM30(B) analysed by RT-PCR

3. RT-PCR 결과 분석

각각의 조건배지를 준 백악모세포의 RT-PCR 분석 결과는 다음과 같다(Figure 4-5, Table 4). RT-PCR은 백악질의 석회화 정도를 판단할 수 있는 지표가 되는 인자인 BSP, ALP, OC 뿐만 아니라 Col I, SPARC의 발현정도를 측정하였다.

BSP는 control을 비롯한 기타 OCCM30에서는 14일째부터 발현을 시작하지만 MDPC23-OCCM30과 OD11-OCCM30에서는 4일째부터 발현되기 시작하였다. 또한 control과 기타 OCCM30에서 OC와 ALP는 7-10일경부터 발현되지만, MDPC23-OCCM30과 OD11-OCCM30에서는 OC는 7일, ALP는 4일부터 발현이 시작되었다. 즉, BSP, OC, ALP의 발현이 control OCCM을 비롯한 기타 OCCM-30에서보다 MDPC23-OCCM30과 OD11-OCCM30에서 훨씬 빠르게 나타났다. 그 외 Col I은 모든 세포군에서 0일째부터 지속적으로 발현되었으며 SPARC도 0일째부터 지속적으로 발현되다가 10일째부터 약간씩 발현하는 양이 감소하는 경향을 보였다.

IV. 고 찰

백악질과 인접하여 있는 해부학적 위치를 고려하여 이 연구에서 선정한 세포주의 특징은 다음과 같다. 주 배양세포인 백악모세포주 OCCM30은 immortalized murine cementoblast cell line 으로

OC-TAg 유전자 도입을 받은 쥐의 하악 제1대구치 치근표면으로부터 collagenase/trypsin digestion을 통해 분리해낸 것이다. 이들 쥐는 osteocalcin promoter의 조절아래 SV40 large T-antigen을 포함한 cementoblast cell(OC/CM cells)을 가지고 있다¹⁰⁾.

섬유모세포주인 NIH3T3 세포주는 NIH 스위스 쥐 배아의 유래로, contact inhibition이 매우 강하여 1.0x10⁶-1.2x10⁶ 이상의 세포밀도에서는 더 이상 세포수가 증가하지 않는다. 하지만 새로운 배지를 첨가하면 세포분열이 증가하는 특징이 있다¹³⁾. 법랑모세포주는 spontaneously immortalized ameloblast-lineage cell line으로 실험관에서 석회화를 유도하는 능력과 같은 정상 법랑모세포의 세포적 특성을 유지한다¹⁴⁾. 상아모세포주로는 MDPC-23과 OD-11을 배양하였다. 이 중 MDPC-23은 CD-1 mouse 하악 제1대구치의 태생18~19일째의 dental papilla cell 유래로 자발적으로 immortalized 된 cloned cell line으로 높은 ALP활성도를 보이며, 상아모세포 분화의 marker인 dentin phosphoprotein과 dentin sialoprotein의 발현을 나타낸다¹⁵⁾. OD-11은 치유두세포(dental papilla cell)유래의 세포주로 MDPC-23과는 발생시기와 단계에서 약간 차이가 있는 것으로, 같은 상아모세포주로 보아도 무방하다. 골모세포주로는 MG-63을 선택하였으며, 이는 형질 전환된 osteosarcoma cell로 초기에는 미성숙 골모세포를 닮았으나 성숙 골모세포 표현형의 발현 조절이 가능하다.

Table 4. Result of RT-PCR

	0일			4일			7일			10일			14일		
	control	MD PC	OD 11	control	MD PC	OD 11	control	MD PC	OD 11	control	MD PC	OD 11	control	MD PC	OD 11
BSP	-	-	-	-	+	+	-	+	+	±	++	++	++	++	++
ALP	-	-	-	-	++	+	-	++	++	+	++	++	++	++	++
OC	±	±	±	±	+	±	±	+	++	+	+	++	++	+	++
SPARC	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
Col I	+	++	++	+	+	++	+	+	++	±	+	±	-	-	-

-: negative, +: positive, ++: strong positive

일반적으로 OCCM-30은 β -glycerol phosphate를 준 배지에서 14일 이내에 석회화 결절을 형성한다. 또한 OCCM-30이 발현하는 유전자에는 Type I과 XII collagen, type I PTH/PTHrP receptor(PTH1R), BSP, OPN, OC 등이 있고, 이들은 cementogenesis를 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 이 실험에서는 Type I collagen, SPARC, BSP, OC, ALP의 유전자 발현을 RT-PCR을 통하여 조사하였다.

BSP 유전자는 기본적으로 석회화 결합조직에 제한적으로 발현되며, 이는 골, 치아, 백악질형성 초기에 높게 나타난다. BSP는 세포부착을 증재할 수 있는 단백질로서 세포의 기질에 축적되며, 수산화인회석 결정을 유해화하며^{16,17)}. 또한 석회화가 일어나는 경조직에서 alkaline phosphatase의 활성이 매우 높게 나타나며, 이는 세포의 β -glycerol phosphate를 분리하고, 백악모세포의 초기 marker가 된다.

Osteocalcin은 뼈모세포, 상아모세포, 백악모세포의 성숙도, 분화정도에 대한 지표가 되며, 무기질 침착의 정도를 조절하는 유전자이다^{18,19)}. Type I collagen은 뼈 조직에서처럼 백악질에서도 가장 주요한 세포의 기질로 기질의 구조를 결정하며 침착되는 무기질을 수용한다. Osteonectin(SPARC)은 칼슘결합 기질 세포성 당단백질로서 세포와 세포외 기질과의 상호작용을 조절하는데, 이 유전자는 성장기의 골, 치아, 배아의 조골세포, 조상아세포, 연골주위 섬유아세포 및 분화기의 연골세포 등에서 고농도로 발현된다. 또한 이는 조직의 재형성, 창상치유, 세포분열, 세포와 기질간 상호작용 등을 조절한다²⁰⁻²²⁾.

이 연구에서 대조군 OCCM-30이 발현하는 유전자들의 분화단계에 따른 발현양상을 살펴보면, BSP는 14일경부터, ALP와 OC는 7-14일 경에 발현된다. 이들 BSP, ALP, OC의 발현시기는 백악모세포의 분화와 무기질 정도를 측정할 수 있는 지표가 된다. Type I collagen과 SPARC는 0일째부터 발현되지만 분화가 진행될수록 발현양이 감소한다.

대조군 OCCM-30을 제외한 OCCM-30 실험군에

서는 조건배지의 transfer를 시행하였다. NIH3T3, Ameloblast, MDPC23, OD11, MG63의 경우는 하루에 두 번 6시간 간격으로 배지 교체를 해주었는데 6시간 정도이면 각 세포가 백악모세포에 영향을 주는 물질을 분비하기에 충분한 시간이다. 6시간이 지난 후, 조건배지를 신선한 분화배지와 1:1의 비율로 하루에 한 번 OCCM-30에 넣어주어 각 세포주의 영향을 평가할 수 있었다. NIH3T3, Ameloblast, MG-63의 조건배지를 준 OCCM-30은 Alizarin red-S 염색과 RT-PCR 분석결과가 control-OCCM은 control OCCM과 유사하였다. 반면 MDPC-23과 OD-11의 조건배지를 받은 OCCM-30은 control과는 다른 양상을 띄었다. Alizarin red-S 염색에서 배양 4일째부터 붉게 염색된 석회화 결절이 관찰되기 시작하였다. RT-PCR 분석결과에 의하면, BSP가 control에서 14일 경부터 발현되는 것에 비해 4일경부터 발현되기 시작하였다. ALP는 control에서 10일경에 발현되지만 4일부터 발현을 보였다. OC 역시 10일경부터 발현되는 control에 비해 MDPC23-OCCM30은 4일경부터, OD11-OCCM30은 7일 경부터 발현이 두드러졌다.

이상의 결과는 MDPC-23과 OD-11의 조건배지가 OCCM-30의 분화 및 석회화에 대한 영향을 확인시켜준다. 상아모세포 조건배지의 효과가 구체적으로 무엇 때문인지 알기 위하여 이 실험에서는 MG63-OCCM30을 배양하였다. 이는 백악모세포의 석회화 및 분화의 촉진이 상아모세포가 분비한 특정인자 혹은 신호전달물질에 의한 것인지, 단지 기질세포의 이행에 의한 것인지를 분별하기 위함이다.

뼈, 상아질, 세포시멘트질과 같은 중배엽성 경조직에서는 각 조직의 기질 생성세포에서 유래된 막에 둘러싸인 기질세포의 기전에 의하여 무기질 침착이 시작된다. 기질세포 안에서 점점 커지는 결정은 결국 세포의 막을 깨뜨리고 주변 기질로 더 퍼져나가서 석회소구를 형성하고 이들이 합쳐져 무기질 침착선을 형성한다. 기질세포는 무기질이 침착될 자리와 시기를 정하고, 또 아교질 섬유를 따라 무기질 침착을 더욱 촉진한다²³⁻²⁷⁾. 주로 ALP의 발현시기와 맞

추어 기질세포가 나타나고 그것은 분화 4일째 정도이다. 전자현미경적으로는, 세포외막의 특정부분으로부터 세포가 극성을 띄며 발아하는 것을 볼 수 있다. 여기에 해당되는 세포는 연골모세포, 골모세포, 상아모세포가 있다²⁸⁾. 그러므로 상아모세포의 기질세포에 의해 백악모세포의 분화 및 석회화 촉진의 가능성을 배제할 수 없다.

MG63의 조건배지를 준 OCCM-30의 RT-PCR 결과는 control에서보다 약간 촉진되었다. BSP는 약 10일경부터, ALP는 7일경부터, 그리고 OC은 약 4일경부터 발현되기 시작하였다. control보다 MG63-OCCM30에서 분화 및 석회화 관련 유전자의 발현이 약간 촉진되었다. 그러나 Alizarin red-S 염색에서 붉게 염색된 결절을 14일 전까지 확인할 수 없는 것으로 보아 MG-63 조건배지의 영향이 광화 촉진까지는 이르지 못했음을 알 수 있다. MG63-OCCM30의 결과로 볼 때, 백악모세포의 석회화 및 분화의 촉진은 기질세포의 이행에 의한 것이 아닌 것으로 생각된다. 그러므로 백악모세포는 상아모세포가 분비한 특정인자 혹은 특정 신호전달물질에 의해 분화 및 석회화가 촉진된 것으로 추정할 수 있으며 이에 대하여는 앞으로 추가 연구가 필요할 것이다.

최근에는 백악질 분화 촉진에 있어서 이 연구와는 달리 HERS 및 enamel matrix protein의 영향이 다양하게 보고되고 있다. 몇몇 연구에 의하면 EMD는 porcine cheese like enamel matrix로서, 신생 결합조직 부착과 새로운 치조골 형성 등과 같은 치주 재생에 긍정적인 효과를 보인다²⁹⁾. 이러한 enamel matrix protein은 상아모세포, 뼈모세포, 백악모세포와 같은 중간엽 세포의 분화 및 광화를 유도한다고 한다. EMD의 구성성분 중 약 90%는 amelogenin이며, 이는 광화 조직 특이 마커인 BSP의 전사를 촉진한다고 알려졌다. 그러나 최근 Hema 등⁴⁾의 연구에 의하면, BSP 발현은 amelogenin의 정량(dose)에 의존적인 것으로 알려졌다. 즉, amelogenin이 낮은 양($0.1\mu\text{g/ml}$)으로 존재할 때에는 BSP의 전사를 촉진하지만, 많은 양($10.0\mu\text{g/ml}$) 존재할 때에는 BSP 발현양이 극적으로 감소하였다. 또한 rp(H)M180에

노출된 백악모세포는 세포 분열의 증가를 보이지 않았지만, EMD에 노출된 백악모세포는 세포 분열이 증가하였다. 이로 미루어 보아 EMD에 노출된 세포들의 증식능은 amelogenin이 아닌 다른 단백질에 의한 것으로 추정된다.

이 실험 결과 역시 ameloblast의 조건배지를 받은 OCCM-30의 BSP발현은 물론, 석회화는 촉진되지 않았다. Alizarin red S 염색에서 배양 14일까지 붉은 석회화 결절이 관찰되지 않았으며, RT-PCR 결과에서도 BSP의 발현은 control과 같이 14일전에는 발현되지 않았다. 그러나, ALP와 OC은 control OCCM-30보다 좀 이른 4-7일경부터 발현되는 것으로 보아, enamel protein과 같은 상피 산물이 백악질의 분화에는 관여하지만 석회화에는 큰 영향을 미치지 못한 것으로 사료된다.

V. 결 론

이 연구는 백악모세포 분화촉진에 대한 상아모세포의 영향을 보여줌으로써, 백악질 재생의 또 다른 가능성을 시사하는 새로운 연구 결과이다. 향후 상아질에서 matrix protein을 추출하여 백악모세포의 배양액에 첨가하거나 생체 세포에 적용하여 백악모세포의 분화에 대한 상아질의 영향을 직접적으로 알아보는 실험과 손상된 치주조직에 상아질 기질 단백질을 적용시켜 재생을 유도하는 임상 실험이 이루어진다면 백악질 재생뿐만 아니라 자연치의 치주재생과 임플란트 술식의 치주적 보완과 같은 치주 재생 치료의 새로운 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

VI. Reference

1. Bosshardt DD and Selvig KA. Dental cementum: The dynamic tissue covering of the root. *Periodontology* 2000 1997;13:4-75.
2. Cho MI and Garant PR. Development and general structure of the periodontium.

- Periodontology 2000 2000;24:9–27.
3. Bosshardt DD and Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: A comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec* 1996;245:267–292.
 4. Hema L, Viswanathan, Janice E, et al. Amelogenin: A potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* 2003;74:1423–1431.
 5. Bosshardt DD and Nanci A. Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem*, 1998;46:135–142.
 6. Fong CD and Hammarstrom L. Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont*, 2000;90:218–223.
 7. Heikinheimo K and Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res* 1995;74:1226–1234.
 8. Kagayama M, Sasano Y, Zhu J, et al. Epithelial rests colocalize with cementoblasts forming acellular cementum but not with cementoblasts forming cellular cementum. *Acta Anat (Basel)*, 1998;163:1–9.
 9. Spahr A and Hammarstrom L. Response of dental follicular cells to the exposure of denuded enamel matrix in rat molars. *Eur J Oral Sci* 1999;107:360–367.
 10. D'Errico JA, Berry JE, Ouyang H, et al. Employing a transgenic animal model to obtain cementoblasts in vitro. *J Periodontol* 2000;71:63–72.
 11. Dawson AB. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Staining Technology* 1926;1:123–124.
 12. Maria M, Simona M, Daniela DR, Luca P, Giovanni S. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online* 2001;3(1):19–25.
 13. Jainchill JL, et al. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 1969;549–553.
 14. Nakata A, Kameda T, Nagai H, et al. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Comm* 2003;308:834–839.
 15. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 1998;37:233–249.
 16. Ganss B, Kim R, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:79–98.
 17. Xiao Y, Haase H, Young WG, Bartold PM. *Cell Transplant* 2004;13:15–25.
 18. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289(5484):1501–1504.
 19. Karsenty G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol*. 2000;11(5):343–346.
 20. Sage H, Vernon RB, Decker J, Funk S, Iruela-Arispe M. Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *J Histochem Cytochem*, 1989;37(6):819–829.
 21. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem* 1991;266(23):14831–14834.

22. 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(6):1433–1444.
23. Anderson HC, Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J cell Biol* 1967;35(1):81–101.
24. Bab IA, Muhrad A, Sela J. Ultrastructural and biochemical study of extracellular matrix vesicles in normal alveolar bone of rats. *Cell Tissue Res* 1979;202(1):1–7.
25. Hoshi K, Ozawa H. Matrix vesicle calcification in bones of adult rats. *Calcif Tissue Int*. 2000;66(6):430–434.
26. Johnson TF, Morris DC, Anderson HC. Matrix vesicles and calcification of rachitic rat osteoid. *J Exp Pathol* 1989;4(3):123–132.
27. 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(4):333–339.
28. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*. 1995;314: 266–280.
29. Shimizu E, Nakajima Y, Kato N, et al. Regulation of rat bone sialoprotein gene transcription by enamel matrix derivative. *J Periodontol* 2004;75(2):260–267.

Regulation of cementoblast differentiation and mineralization using conditioned media of odontoblast

Sang-Won Moon¹, Hye-Sun Kim¹, Hyun-Jung Song¹, Hong-Kyu Choi¹, Jong-Tae Park¹,
Heung-Joong Kim², Hyun-Seon Jang², Joo-Cheol Park^{1,2,*}

¹Dept. of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University

²Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun University

For the regeneration of periodontal tissues, the microenvironment for new attachment of connective tissue fibers should be provided. At this point of view, cementum formation in root surface plays a key role for this new attachment. This study was performed to figure out which factor promotes differentiation of cementoblast.

Considering anatomical structure of tooth, we selected the cells which may affect the differentiation of cementoblast - Ameloblast, OD11&MDPC23 for odontoblasts, NIH3T3 for fibroblasts and MG63 for osteoblasts. And OCCM30 was selected for cementoblast cell line. Then, the cell lines were cultured respectively and transferred the conditioned media to OCCM30. To evaluate the result, Alizarin red S stain was proceeded for evaluation of mineralization. The subjected mRNA genes are bone sialoprotein(BSP), alkaline phosphate(ALP), osteocalcin(OC), type I collagen(Col I), osteonectin(SPARC ; secreted protein acidic and rich in cysteine). Expression of the gene were analysed by RT-PCR.

The results were as follows:

1. For alizarin red S staining, control OCCM30 didn't show any mineralized red nodules until 14 days. But red nodules started to appear from about 4 days in MDPC-OCCM30 & OD11-OCCM30.
2. For results of RT-PCR, BSP mRNAs of control-OCCM30 and others were expressed from 14 days, but in MDPC23-OCCM30 & OD11-OCCM30 from 4 days. Like this, the gene expression of MDPC23-OCCM30 & OD11-OCCM30 were detected much earlier than others.
3. For confirmation of odontoblast effect on cementoblast, conditioned media of osteoblasts(MG63) which is mineralized by producing matrix vesicles didn't affect on the mineralized nodule formation of cementoblasts(OCCM30).

This suggest the possibility that cementoblast mineralization is regulated by specific factor in dentin matrix protein rather than matrix vesicles. Therefore, we proved that the dentin/odontoblast promotes differentiation/mineralization of cementoblasts. This new approach might hold promise as diverse possibilities for the regeneration of tissues after periodontal disease.