

교원질과 당단백이 치수섬유모세포에 미치는 효과에 관한 연구

경희대학교 치과대학 보존학 교실

김주연 · 최호영

Abstract

THE EFFECT OF ADHESIVE GLYCOPROTEIN ON THE ACTIVITY OF HUMAN PULP FIBROBLAST

Ju-Yon Kim, D.M.D., Ho-Young Choi, D.D.S., Ph.D.

Dept. of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University

The purpose of this vitro study was to evaluate the activity of human pulpal cells to adhesive glycoprotein-coated and non-coated culture dishes.

Well known adhesive glycoproteins were used, such as type I collagen, type IV collagen, fibronectin, laminin, and vitronectin. Each adhesive glycoproteins applied onto the culture dishes. In this study, the protein coated and non-coated dishes were classified as each groups. Human pulpal cells cultured onto each groups. After 24 hours, 48 hours, 72 hours incubation time, radioactivity with scintilation counter for evaluation of the activity of human pulpal cells.

The results as follows :

1. After 24 hours incubation time, activity of human pulpal cells were best in laminin-coated group among groups. Then fibronectin, type I collagen group were better, and all proteins were better than control.
2. After 48 hours incubation time, activity of human pulpal cells were best in fibronectin coated group.
3. After 72 hous incubation time, activity of human pulpal cells were not significantry different in all of adhesive glycoproteins.
4. After 24 hours incubation time, activity of human pulpal cells were best in fibronectin and laminin coated group. Activity of human pulpal cells in type I collagen coated group were better after 24 hours incubation time then 48 hours incubation time.

I. 서 론

치수에서 가장 많은 세포는 섬유모세포로서 이들은 특히 치수치관부위에 많이 모여 세포 밀집대를 형성하며, 치수에서 조섬유세포의 기능은 교원과 간질물질로 이루어진 치수간질을 형성, 유지하는 것이다.

치수의 기질물질은 다른 소성결합조직의 기질과 유사하며 주로 교원질과 단백질, 당단백질, 그리고 수분으로 되어 있어 세포를 지지하고, 혈류로부터 세포에 영양공급과 세포로부터 혈류로 대사물 수송의 매개체 역할을 한다. 노화나 질병으로 야기되는 기질물질 조성의 변화는 이러한 기능에 장애를 주어 대사 변화와 세포기능 감소, 그리고 불규칙한 무기질 침착을 야기한다.

생체내에서 생성되는 단백질중에는 부착단백질로 알려진 fibronectin, collagen, laminin, 그리고 serum spreading factor로 알려진 vitronectin 등이 있으며, 이들 부착단백질들은 각각의 세포표면 수용체에 결합하여 세포가 세포외기질에 결합하는 것을 매개하는 역할을 한다¹⁰. 이러한 부착단백질들은 세포의 부착 및 증식을 향진시키며, 시험관내에서 배양되는 치수세포는 부착단백질로 도포된 배양접시 표면에 더 잘 부착하는 것으로 알려져 있다¹⁻⁴).

교원질은 인체 결합조직중 가장 많은 부분을 차지하는 단백질로서, 다양한 유형으로 존재하게 된다. 그 중 치아기를 포함하는 조직에서는 제1형, 제3형 및 제4형 교원질이 모두 발견되고 있다. 이 중 제4형 교원질은 기저막에서만 특이하게 발견되는 형태로, 주로 기저막의 구조를 유지하며⁵, 치아 형성에 중요한 역할을 하는 치유두 및 치낭에서는 제1형 및 제3형 교원질이 나타난다. 제3형 교원질은 배아의 신생조직에서 특징적으로 나타나는 교원질로서⁶ 치아 및 주위조직에서는 비교적 적은 양이 분포하여 간엽세포가 분화됨에 따라 그 양이 줄어드는 것으로 알려져 있다.

교원질에 부가하여 최종적으로 분화된 상아모세포는 상아질 세포외기질 속으로 몇가지 비교원성 단백질을 합성 분비한다⁷. Fibronec-

tin 과 제1형 교원질은 치수세포에 효과를 나타낼 것으로 기대되며 일찌기 섬유모세포의 부착실험에 사용된 바 있고⁸⁻¹⁰, 최근에 와서 상품화된 vitronectin은 혈장성분의 하나로 치수세포의 부착에 영향을 미친다고 보고된 바 있다¹¹. 또한 Meffert^{12,13}는 상피에서 생산되는 laminin이 섬유모세포의 부착에 역할을 할 것으로 역설한 바 있으나 아직 실험적인 근거는 제시되지 않고 있으며 이러한 맥락에서 laminin과 함께 기저막의 구성성분인 제4형 교원질의 효용에 관해서도 검토가 제기되고 있다.

Brunett¹⁴는 섬유모세포에 있어 선택적인 친화성을 갖는 단백질을 찾기 위해서는 일정하게 조절된 조건하에서 여러가지 단백질의 효과를 비교분석해야 할 필요성을 강조하였다.

손상받은 치수의 치유과정에서 손상받은 상아모세포를 대체시키는 전구세포의 기원에 대해 Torneck¹⁵, Ruch¹⁶ 및 Veis¹⁷ 등은 치수의 가장자리에 위치한 세포치밀층에서부터 미성숙 상아모세포가 증식, 이동하여 부착한다고 하였고, Fitzgerald^{18,19}와 Yamamura²⁰는 치관세포의 중심에서 손상부위로 치수섬유모세포, 혈관벽세포 혹은 미분화간엽세포들이 증식을 거치고 분화된 상아모세포를 기질형성세포의 특징으로 발육된다고 하였다.

Thesleff 등^{21,22}은 치아형성시 상아기질이라 불리는 독특한 석회화기질을 합성 분비하는 상아모세포는, 외배엽성 중배엽으로 구성된 두 세포에서 분화, 이동하고 상피근초에 부착되어 상아질을 형성하는데 이러한 과정은 여러 가지 세포외기질성분을 가지고 있는 상피외간엽의 상호작용에 의해 이뤄진다고 하였다.

Souza⁹는 이 시기에 가장 먼저 분비 합성되어 변화를 일으키는 것은 교원질이라 하였고, Butler²³는 교원질에 부과되어 분화된 상아모세포를 상아기질속으로 부착성 비교원단백질을 합성 분비한다고 하였다.

따라서, 치수조직의 발육과정, 병적과정 및 치유과정은 치수세포의 분화, 부착과 증식에 의해 이루어지므로 세포외기질성분중 부착성이 강한 부착단백질이 치수세포의 증식에 미치는 영향을 평가하는 것은 의미있는 일이라 할 것

이다.

본 연구는 생체내에서 합성되며 그 특성이 알려져 있는 부착단백질인 제1형 및 제4형 교원질과 fibronectin, laminin, vitronectin을 사용하여 부착단백질의 역할과 효과를 알아봄으로써 기존학설을 정리, 체계화하며 나아가 부착단백질의 임상적 응용을 위해 기본적으로 선행되어야 할 연구로 사료되어 사람치수세포를 분리배양하고 부착단백질들을 도포하여 방사선 동위원소를 이용한 [3H]-thymidine assay를 통해 부착단백질이 사람치수세포의 활성화에 미치는 영향을 연구하여 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 사람 치수섬유모세포의 분리 및 배양

사람 치수섬유모세포는 교정목적으로 발거된 소구치로부터 얻었다. 소구치는 발거 즉시 100 unit/ml의 penicillin과 100µg/ml의 streptomycin (P-S : Gibco)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Media(DMEM : Gibco)로 3회 세척하고 근원심 방향으로 쪼개어 치수조직을 얻었다. 이렇게 얻은 치수조직은 다시 DMEM으로 세척한 후 면도날로 1 mm² 이하의 크기가 되도록 잘게 잘랐다. 이것을 각각 배양접시에 넣고, 10% fetal bovine serum(FBS : Gibco)

Table 1. Activity of human pulpal fibroblasts on culture dishes coated with adhesive proteins after 24 hours of incubation.

Group	mean(CPM)	SD	p-value
Control	4494.50	212.44	
Collagen I	4879.75	207.77	0.0205
Collagen IV	3843.50	255.26	0.0039
Fibronectin	7504.50	1063.09	0.0007
Laminin	8109.50	220.79	0.0000
Vitronectin	4506.75	112.52	0.4611

Table 2. The ratio control of radioactivity after 24 hours in incubation.

Group	mean	SD
Control	1.00	
Collagen I	1.09	0.05
Collagen IV	0.86	0.06
Fibronectin	1.67	0.24
Laminin	1.80	0.05
Vitronectin	1.00	0.03

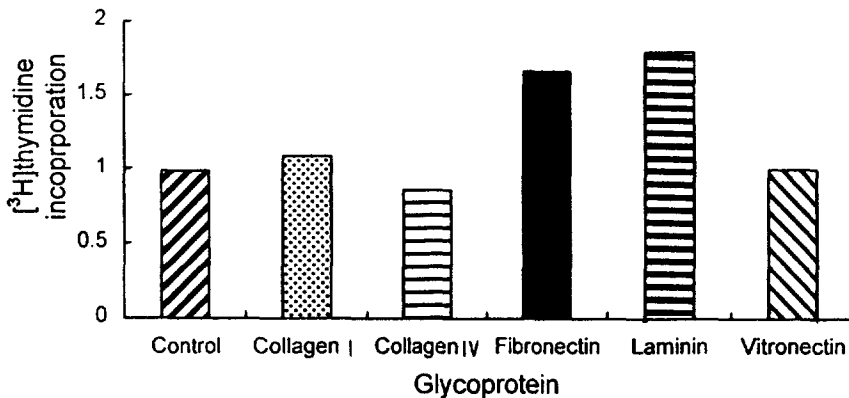


Fig. 1. Ratio to control(after 24Hours)

이 포함된 DMEM으로 37 °C, 5% 이산화탄소에서 배양하였다.

세포가 어느정도 자라나오면 원래의 조직은 떼어내고 세포가 한층으로 배양접시에 가득 찰 때까지 동일한 배양액으로 배양하였다. 세포가 배양접시에 가득차면 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS : Gibco)로 수세하고 trypsin-EDTA 용액(Gibco)으로 세포를 분리하여 계대배양하였다. 배양액은 동일하며, 주 3회 교환하였다. 이렇게 얻은 세포중 5대의 세포를 실험에 사용하였다.

2. 부착단백질 도포

부착단백질은 제1형 교원질, 제4형 교원질, fibronectin, laminin, vitronectin (Sigma)을

사용하였으며 아래의 방법으로 24-well tissue culture plate에 coating 하였다. 대조군은 아무 처리도 하지 않았다.

1) 제1형 및 제4형 교원질 도포군

10 μ g/cm²의 농도로 배양용기 바닥에 도포한 후 4 °C에서 하룻밤 방치하여 단백질이 부착되도록 하였다. 그후 나머지 액체를 제거하고 다시 4 °C에서 하룻밤 방치하여 건조시킨 후 사용하였다.

2) Fibronectin과 Laminin 도포군

1 μ g/cm²의 농도로 배양용기 바닥에 도포한 후 45분간 실온에 방치하여 단백질이 부착되도록 하였다. 그후 나머지 액체를 제거하고 즉시 사용하였다.

Table 3. Activity of human pulpal fibroblasts on culture dishes coated with adhesive proteins after 48 hours of incubation.

Group	mean(CPM)	SD	p-value
Control	4275.75	214.50	
Collagen I	5319.50	184.54	0.0002
Collagen IV	4893.50	83.31	0.0009
Fibronectin	5885.25	346.71	0.0001
Laminin	5763.50	727.81	0.0039
Vitronectin	4469.00	252.15	0.1436

Table 4. The ratio control of radioactivity after 48 hours in incubation.

Group	mean	SD
Control	1.00	
Collagen I	1.18	0.04
Collagen IV	1.09	0.02
Fibronectin	1.31	0.08
Laminin	1.28	0.16
Vitronectin	0.99	0.06

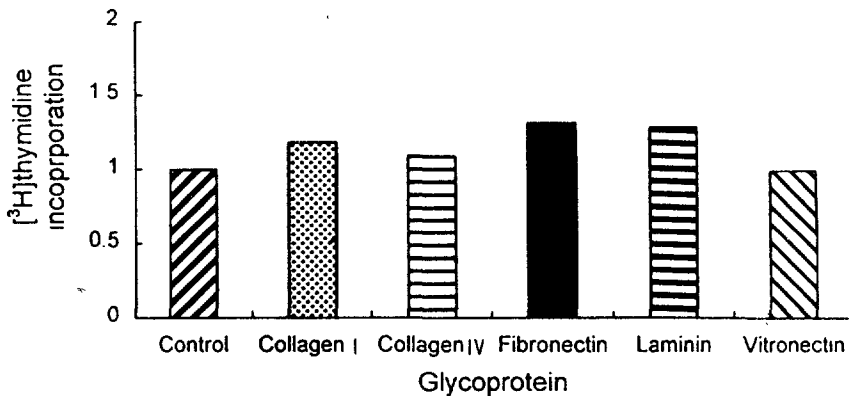


Fig. 2. Ratio to Control(after 48hours)

3) Vitronectin 도포군

0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도로 배양용기 바닥에 도포한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 방치하여 단백질이 부착되도록 하였다. 그후 나머지 액체를 제거하고 즉시 사용하였다.

3. [3H]-thymidine incorporation assay

사람 치수섬유모세포를 adhesive glycoprotein이 coating된 24-well tissue culture plate에 세포수가 well당 2×10^4 가 되도록 분주하였다.

배양액은 10% FBS가 포함된 DMEM이었으며, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 이산화탄소하에서 배양하면서 24시간, 48시간, 72시간 쯤에 세포의 활성을 [3H]-thymidine incorporation assay로 평가하

였다. 각 군 배양시간의 마지막 2시간 동안 세포가 어느정도 자라나오면 [3H]-thymidine (Amersham Life Science : specific activity 925 GBq/m mol, 25 Ci/m mol)을 well당 최종 농도가 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 이 되도록 첨가하여 배양하였다. 그후 thymidine이 첨가된 DMEM을 제거해 내고, 0.5% trichloroacetic acid(TCA : Sigma)를 well당 500 μl 씩 첨가하고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 방치하여 고정하였다. 그후 TCA로 세척하고, 0.5 N sodium hydroxide를 well당 200 μl 씩 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ dry oven에서 1시간 동안 방치하였다. Scintillation vial에 ScintiVerse (Fisher scientific) 10 μl 씩을 넣고 각 well에서 얻은 추출물을 각각의 vial에 넣은 후 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다.

Table 5. Activity of human pulpal fibroblasts on culture dishes coated with adhesive proteins after 72 hours of incubation.

Group	mean(CPM)	SD	p-value
Control	5166.50	221.71	
Collagen I	5896.00	415.93	0.0106
Collagen IV	4860.25	267.75	0.0643
Fibronectin	5953.50	312.36	0.0031
Laminin	5536.25	632.06	0.1599
Vitronectin	5473.00	509.40	0.1561

Table 6. The ratio control of radioactivity after 72 hours in incubation.

Group	mean	SD
Control	1.00	
Collagen I	1.14	0.08
Collagen IV	0.94	0.05
Fibronectin	1.15	0.06
Laminin	1.07	0.12
Vitronectin	1.06	0.10

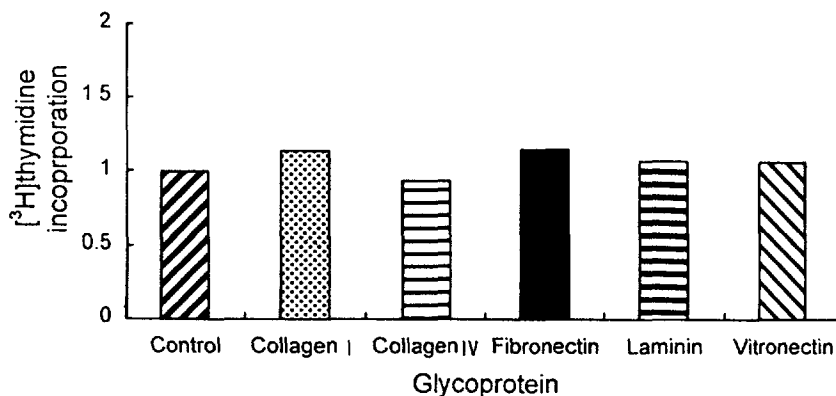


Fig. 3. Ratio to Control(after 72hours)

4. 통계처리

실험에서 얻어진 data는 unpaired, double-sided Student's t-test로 분석하여 통계학적 유의성을 검증하였다.

III. 실험성적

[³H]-Thymidine incorporation assay로 측정된 섬유모세포의 활성도는 다음과 같다. 배양시간에 따른 섬유모세포의 활성도는 Fibro nectin 도포군은 24시간, 48시간, 72시간 모두에서 가장 높은 세포활성을 보였으며, 24시간에서 laminin 도포군, 48시간에서 laminin 도포군, 72시간에서 제1형 교원질 도포군을 제외한 나머지 군들과 유의한 차이를 나타내었다. Laminin도포와 vitronectin 도포군에서는 배양 후 24시간과 48시간에서 laminin 도포군이 vitronectin 도포군 보다 유의하게 높은 세포증식도를 보였으며, 배양 후 72시간에서는 두 군간에 유의한 차이가 없었다. 제4형 교원질 도포군은 배양 24시간에 가장 낮은 세포활성도를 보였으며, 48시간과 72시간에서는 제1형 교원질 도포군과 유의차가 없는 세포활성도를 보였다. 제1형 교원질 도포군은 24시간에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았고, 48시간과 72시간에서 약간 높은 세포활성도를 보였다.

IV. 총괄 및 고안

치수를 구성하고 있는 세포중 섬유모세포가 가장 많이 분포되어 있으며, 이들은 특히 치수 치관부위에 많이 모여 세포밀집대를 형성하며, 치수에서 섬유모세포의 기능은 교원과 간질물질로 이루어진 치수간질을 형성, 유지하는 것이다. 그들의 조직학적 구조는 기능적 상태를 반영한다. 어린 치수에서는 섬유모세포가 활동적으로 간질을 합성하므로 합성과 분비에 관계된 모든 통상적 소기관들을 다량 함유하며 개면핵을 갖고 있는 풍부한 세포질을 갖는다. 연령이 증가함에 따라 합성의 필요성은 감소하고 섬유모세포는 폐면핵을 갖는 납작하고 방추형의 세포로 나타난다. 치수의 섬유모세

포는 적당한 자극을 받으면 교원질을 섭취, 분해시키는 능력을 갖는 것으로 최근에 밝혀졌다.

미분화간엽세포는 치수의 다른 결합조직 세포들이 기원하는 세포집단을 말한다. 이 세포들은 자극에 따라 상아모세포와 섬유모세포로 분화될 수 있다. 이들은 세포밀집대와 치수 심부 전체에 걸쳐 발견되며 종종 혈관과 관련되어 있다. 광학현미경하에서 이 세포 중앙에 위치하는 크고 열게 염색되는 핵을 갖는 큰 다각형 세포로 보인다. 이들은 풍부한 세포질과 세포 돌기를 가지고 있다. 노쇠한 치수에서는 미분화간엽세포의 수가 치수심부의 다른 세포들과 마찬가지로 감소하며, 이는 다른 노화요인들과 연관되어 치수재생 능력의 감소를 가져온다.

치수의 세포의 구간 혹은 기질은 교원섬유와 기질 물질로 구성되며, 섬유는 주로 제1형과 제3형 교원질이 발견되며 그 비율은 약 55 : 45이다. 이 비율은 치아발생 초기로부터 성숙될 때까지 일정하게 유지되며 이는 상아질의 제1형 교원질이 상아모세포와 치수섬유모세포의 공동 산물이 아니라 조상아세포만의 독자적인 산물이라는 견해를 뒷받침하고 있다. IGF- I 는 rat 어린 치수에서는 단일 교원원섬유가 치수세포들 사이에 산재되어 있다. 치수의 전체 교원량은 연령에 따라 증가하는 반면 제1형과 제3형 사이의 비율은 일정하게 유지되며 세포외교원질의 양이 증가하면서 섬유다발을 만들게 된다. 교원질의 농도는 대개 치수의 치관단 부위에서 가장 높게 나타나며, 이와 같은 사실은 근관치료 중 치수절제술을 시행할 때 중요한 의미를 갖는다. Barbed broach로 근단부위에서 치수를 감는 것이 치수가 더 아교질이며 찢어지기 쉬운 치관부에서 감는 것보다 조직을 원상태대로 제거할 수 있는 가능성이 더 높은 것이다. Cell에서 똑같은 효과가 있다고 알려져 있다.

치수의 기질물질은 다른 소성 결합조직의 기질과 유사하다. 주로 glycosaminoglycan, 당단백질 그리고 수분으로 되어 있어 세포를 지지하고 혈류로부터 세포로의 영양공급과 세포로부터 혈류로의 대사물 수송의 매개체 역할을 한다. 노화나 질병으로 야기되는 기질물질

조성의 변화는 이러한 기능에 장애를 주어 대사 변화와 세포기능 감소 그리고 불규칙한 무기질 침착을 야기한다.

최근에 조직의 발생 및 치유과정을 이해하기 위해서 세포외기질성분을 분석하는데 관심이 쏠리고 있다. 이 중 부착성 단백질은 세포부착, 세포와 세포의 교통 및 세포이동과 같은 세포 활동 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다²⁴⁻²⁶. 그러나 이들 부착성 단백질의 구강조직에서의 그들의 역할에 관한 정보는 드물며, 특히 치수세포에 대한 이들 단백질의 부착 및 증식에 미치는 효과를 비교한 연구는 의미 있는 일이다. 이러한 이유에서 본 실험은 제1형 교원질을 비롯해서 다섯종류의 부착단백질이 치수세포의 활성화에 미치는 효과를 비교 분석하였다.

제1형 교원질은 인체에서 가장 많은 비중을 차지하고 섬유모세포와 상아모세포에 의해 합성 분비되어 치아결합조직에 널리 존재하는 것으로 보고된 바 있다^{2,27,28}. 제1형 교원질은 나아가 유기 상아기질의 주성분을 형성하는 기능적인 상아모세포의 분화를 조절하는 단백질이다.

한편 본 실험에서는 제1형 교원질은 상아모세포의 분화와 관계없이 전체적으로 균등하게 염색되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 세포 분화가 일어난 부위에 축적되었다가 세포분화가 완성되면 사라지는 현상을 볼 수 없었는데, 이것으로 보아 제1형 교원질은 세포의 분화에는 관여하지 않으며 단지 상아질을 구성하는 유기질의 주성분으로서 상아모세포에 의해 분비되는 것으로 볼 수 있다.

상아질에서는 석회화된 상아질보다 상아전질에서 제1형 교원질에 대해 더 강한 반응을 보였으며 이것은 이전의 연구들^{29,30}과 그 결과가 일치하는데, Carmichael등³¹은 상아질과 상아전질에 존재하는 교원질 사이에 생화학적 차이점은 없다고 하였다. 따라서 이러한 결과는 치조골과 마찬가지로 무기질 결정에 의해 항원결정인자가 가려졌거나 고정액 침투정도의 차이 때문이라고 여겨진다.

제4형 교원질은 주로 기저막의 성분으로 알려져 있고 상피세포, 내피세포 및 근육세포

등에 의해서 합성 분비되며 이들 제1형, 제4형 교원질은 세포부착성을 가지고 세포의 이동, 부착에 영향을 미친다고 보고되고 있다²⁹.

Fibronectin은 섬유소와 새로 형성된 교원섬유와 관련된 물질부분에서 분포되었다. 섬유소와 관련된 fibronectin의 연구는 이 물질이 섬유소에 부착된다는 vitro 연구들과 일치되었다^{32,33}. 이 fibronectin의 기원은 혈장이며 급성염증 혹은 뒤따르는 외상에서 자연스럽게 발생하는 혈장의 fibronectin 농도의 상승에서 기인한 것이다^{34,35}. 섬유소분자가 fibronectin에 의해 싸여져서 세포 이동층을 형성하여 섬유모세포가 섬유소에 부착하게 된다. 따라서 fibronectin의 증가는 치수세포의 이동을 향상시키게 된다³⁶.

치유과정의 초기단계에서 새로운 교원질의 합성에서 fibronectin의 기원은 잘 모른다. 일부 가능성은 fibronectin이 새로 형성된 기질의 일부분이라는 것이다. 여러 연구의 배양된 섬유모세포에서 교원질과 함께 fibronectin이 생성, 분비되었는데 fibronectin은 새로 형성되는 조직에서 교원질에 강하게 부착된다³⁷. 섬유모세포는 교원질의 생성과 함께 파괴하는 능력도 가진다³⁸. Fibronectin은 결합조직 기질의 주성분이며 기저막에도 분포하는³⁹ 분자량이 큰 당단백질로 주로 세포와 세포사이 혹은 세포와 세포의 구성분 사이의 부착을 중개하는 기능을 가진 것으로 알려져 있다⁴⁰. 상아모세포의 분화와 fibronectin 사이의 관계에서 본 Thesleff 등³⁰에 의하면 간엽세포로부터 상아모세포가 분화될 때 fibronectin은 감소한다고 하였으며 또한 간엽세포가 상아모세포로 분화되기 전에는 치아기의 기저막과 더불어 그 주위 간엽세포층에도 fibronectin이 존재하지만 상아모세포로 완전히 분화하게 되면 기저막에만 국한되어 fibronectin이 분포하게 된다고 하였다. 이렇게 fibronectin의 분포가 변화하는 것은 신장의 세관이 분화될 때도 동일하게 나타난다고 한다⁴¹. Fibronectin은 기저막의 주성분으로서⁴² 세포를 제자리에 위치시키고 세포가 그 위치에 부착되어 있도록 해주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 단백질이 상아모세포의 견인과 안

정성에 중요요소인 것으로 보인다⁴³). 이렇게 fibronectin은 기저막과 분화중인 간엽세포 사이에서 서로가 긴밀한 접촉을 유지하도록 하는 역할을 하는 것으로 보이는데 이러한 긴밀한 접촉은 상아모세포의 분화를 유도하는 유도인자의 전달에 필수적인 요소로 생각된다. 이러한 역할은 다른 부위에서의 fibronectin의 분포를 살펴보아도 알 수 있는데, fibronectin은 흰쥐나 사람 피부에 있어서 안정되고 이미 분화가 끝난 부위에서는 발견되지 않는다⁴⁴). 완전히 분화되어 치수주위상아질을 형성중인 상아모세포의 경우 세포체는 fibronectin에 대해 거의 염색되지 않았으나, 세포의 근심단쪽 세포 인접면 세포막에서 fibronectin 분포를 관찰할 수 있었다. 따라서 fibronectin은 상아모세포의 분화뿐 아니라 상아모세포간의 부착에도 관여하는 것으로 생각된다. 이러한 세포간 부착은 전상아질 부위를 외부환경으로 부터 봉쇄시키는 역할을 함으로써 이온에 대해 서로 다른 투과성을 보이는 장벽으로 작용하여 광화과정중에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보인다⁴⁵). 또한 본 실험의 전상아질에서는 fibronectin이 중등도의 염색성을 나타내었다. 그러나 광화된 상아질은 fibronectin에 대해 거의 반응을 나타내지 않았다. 이러한 현상은 이전의 보고들과 일치하며^{30, 46}), 골, 연골, 건 등에서도 관찰된다^{47, 48}). 이러한 현상은 fibronectin의 항원성을 나타내는 부위가 무기질에 의해 가려졌기 때문이라고도 볼 수 있다. 그러나 탈회표본에서도 이러한 현상을 보인다는 것은 설명하기 힘들다. 그런데 fibronectin이 광화를 방해한다는 몇몇 증거들이 있다⁴⁹). 따라서 상아질이 완전히 광화되기 위해서는 fibronectin이 사라져야 할 필요가 있다. 전상아질에 존재하는 단백당은 광화될 때 일부는 광화되고, 광화가 진행되는 과정에서 조직으로부터 점차 제거된다고 한다. 이러한 이유에서 이 부위의 fibronectin이 대사되었을 수도 있다⁵⁰).

Vitronectin은 최근에 human serum에서 분리된 부착단백질로서 serum spreading factor로 알려져 있다. Culture에서 자란 세포의 증식, spreading을 향상시키며⁵¹), 소성결합조직의 탄

력섬유와 연관되어 나타났으며^{52, 53}), fibronectin과는 달리 기저막에선 발견되지 않고 있다. 또한 vitronectin은 나이와 관련되어 6세 이전 어린이의 피부에서는 발견되지 않았다.

Laminin은 기저막에서 발견되며, 이곳에서 제4형 교원질에 상피세포의 부착을 증개하는 단백질로 알려져 있다⁵³). 또한 이 단백질은 세포부착^{27, 54}), 창상치유⁵⁵) 및 세균부착^{56, 57}) 기능이 알려져 있다.

한편 상피세포에서 합성 분비되고 상피세포에 대하여 주로 세포증식효과를 가질 것으로 생각된 제4형 교원질과 laminin도 치수세포의 증식에 높은 촉진효과를 나타낸 것으로 관찰되었다. Laminin은 부착초기에 높은 증식능을 보였으며 제4형 교원질도 fibronectin과 함께 주사전자현미경상에서 높은 세포퍼짐 현상을 보였다.

한편 섬유모세포는 이러한 부착단백질에 대한 수용체를 모두 가지고 있는 것으로 알려져 있다⁵⁰). 이러한 수용체 부위에 부착단백질은 세가지 아미노산이 배열된 RGD(arginin-glycine-aspartic acid) 배열구조를 가지고 있다고 보고되고 있다^{11, 54}). 이러한 RGD 배열은 세포막의 integrin 수용체에 결합하고 이는 다시 세포내 골격 구조인 actin filament에 연결되어 있으므로 부착단백질의 결합은 간접적으로 세포에 영향을 미쳐 세포의 분화, 이동, 부착의 기능을 하는 것으로 생각되고 있다⁵⁰).

본 실험에서 각각의 부착성 단백질을 도포후 24시간, 48시간 및 72시간에 각각 세포활성도를 측정하였다. 초기에 laminin, fibronectin 도포군이 높은 세포활성을 나타내었고 다음으로 제1형 교원질 도포군, vitronectin 도포군 제4형 교원질 도포군 순으로 나타났으나 모든 단백질에서 대조군에 비해서는 유의성 있게 세포활성도가 증가되었음을 관찰하였다. 그 후 fibronectin 도포군과 laminin 도포군은 여전히 높은 활성도를 보였다.

Scott⁵⁶)는 제1형 교원질이 상피세포의 증식을 촉진시킨다고 보고하였고, Couchman⁵⁷)등은 laminin이 섬유모세포에 의하여 증식이 촉진된다는 보고들과 일치하고 있었다. 더우기 치아

발육시, 상아모세포가 분화될 때 상피세포 기원인 상피근초가 치유두의 간엽세포를 분화, 이동시키는 기전으로 미루어 보아 그 기원이 서로 다른 상피세포와 치수세포가 생성하는 단백질과 각 세포들간에 상호유도반응이 일어날 수 있으며, 본 실험의 결과도 이에 부합되는 것으로 보여진다.

이상의 결과로 부착단백질의 종류에 따라 치수세포의 활성화에 미치는 효과가 차이가 있으므로, 치수세포가 다양한 종류의 단백질에 대해 수용체를 가지고 있다 하더라도 그 수용체의 수, 혹은 친화성에 있어 차이가 있으며, 이러한 차이가 각 부착단백질에 대한 치수세포의 활성화에 미치는 효과에 영향을 줄 것으로 생각된다. 본 연구에 사용한 부착단백질들은 그 특성이 규정되어 있고 상품화되어 있는 것들로서 이들 단백질의 치수세포에 미치는 효과가 확립된다면 쉽게 임상에서 응용할 수 있으리라 기대되므로 앞으로 좀 더 깊은 분자생물학적 연구가 진행되어야 한다고 사료된다.

V. 결 론

부착단백질이 치수섬유모세포의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해 생체내에서 합성되며 그 특성이 알려져 있는 부착단백질인 제1형 교원질, 제2형 교원질, fibronectin, laminin, vitronectin을 사용하여, 각각의 부착단백질을 배양접시에 도포한 균을 실험군으로 하고, 부착단백질을 도포하지 않는 경우를 대조군으로 하여 그 위에서 사람 치수섬유모세포를 배양하였다. 배양 후 24, 48, 72시간에 [3H]-thymidine을 첨가하여 부착단백질 도포에 따른 섬유모세포의 활성화에 미치는 효과를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 24시간에서 치수섬유모세포의 활성화는 laminin 도포군과 fibronectin 도포군에서 높게 나타났으며 제1형 교원질 도포군과 vitronectin 도포군은 그 다음으로 활성도를 보였고, 제4형 교원질 도포군은 제일 낮게 나타났다.

2. 48시간에서는 fibronectin 도포군과 laminin 도포군의 세포활성도는 여전히 높게 나타났으며 제1형 교원질 도포군, 제4형 교원질 도포군, vitronectin 도포군 순으로 나타났다.
3. 72시간에서 모든 부착단백질에 대한 섬유모세포의 증식도는 비슷하게 차이를 보이지 않았다.
4. Fibronectin 도포군과 laminin 도포군이 24시간에서 사람 치수섬유모세포에 큰 영향을 주었으나 48, 72시간 후에는 감소하였으며, 제1형 교원질 도포군은 24시간에서 보다 48시간에서 증가된 활성도를 보였다.

REFERENCES

1. Cooper, L.F., Handelman, B., McCormack, S.M., and Guckes, A.D. : Binding of murine osteoblastic cells to titanium disks and collagen I gels : Implications for alternative interpretations of osseointegration, *Int. J. Oral Maxillofac. Impl.*, 8 : 264-272, 1993.
2. Hakkinen, L., Yli-Urpo, A., Heino, J., and Larjava, H. : Attachment and spreading of human gingival fibroblasts on potentially bioactive glasses in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, 22 : 1043-1059, 1988.
3. Seitz, T.L., Nooman, K.D., Hennch, L.L., and Noo man, N.E. : Effect of fibronectin on the adhesion of an established cell line to a surface reactive biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res.*, 16 : 195-207, 1982.
4. Steele, J.G., Johnson, G., and Underwood, P.A. : Role of serum vitronectin and fibronectin in adhesion of fibroblasts following seeding onto tissue culture polystyrene. *J. Biomed. Mater. Res.*, 26 : 861-884, 1992.
5. Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W., and Martin, G.R. : Basement membrane

- complexes with biological activity. *Biochemistry* 25 : 312–318, 1986.
6. Timpl, R., Wick, G., and Gay, S. : Antibodies to distinct types of collagens and procollagens and their application in immunohistology. *J. Immun. Meth.*, 18 : 165–182, 1977.
 7. Butler, W.T. : Dentin matrix proteins and dentinogenesis. Proceedings of the Vth international conference on tooth morphogenesis and differentiation, May 4–8, 1994, Kerkrade, The Netherlands. Woltgens, J.H.M., Bronckers, A.L.J.J., Lyaruu, D.M., editors. *Connect. Tissue Res.*, 32(1), 1995.
 8. Guy, S.C., McQuade, M.J., Scheidt, M.J., McPherson, III, J.C., Rossmann, J.A., and Van Dyke, T.E. : *In vitro* attachment of human gingival fibroblasts to endosseous implant materials. *J. Periodontol.*, 64 : 542–546, 1993.
 9. Lowenberg, B.F., Aubin, J.E., Deporter, D.A., Sodek, J., and Melcher, A.H. : Attachment, migration, and orientation of human gingival fibroblasts to collagen-coated, surface-demineralized, and untreated root slices. *J. Dent. Res.*, 64 : 1106–1110, 1985.
 10. Von Recum, A.F., Schreuders, P.D., and Powers, D.L. : Basic healing phenomena around permanent percutaneous implants. *Proc. Int. Cong. Tissue integration, Brussels, Current Practice Series %29, Excerpta Medica*, 159–169, 1985.
 11. Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M.D. : New perspectives in cell adhesion : RGD and integrins. *Science*, 238 : 491–497, 1987.
 12. Meffert, R.M. : The soft tissue interface in dental implantology. *J. Dent. Educ.*, 52 : 810–811, 1988.
 13. Meffert, R.M. : Periodontal implications of endosseous implants, *Periodontal diseases*, 2nd ed. Philadelphia : Lea & Febiger, pp. 707–731, 1990.
 14. Brunette, D.M. : The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 3 : 231–246, 1988.
 15. Torneck, C.D., and Wagner, D. : The effect of a calcium hydroxide liner on early cell division in the pulp subsequent to cavity preparation and restoration. *J. Endocrinol.*, 6 : 719–723, 1980.
 16. Ruch, J.V. : Tooth morphogenesis and differentiation. In : *Dentin and dentinogenesis*. Linde, A., editor. Boca Raton, FL : CRC Press, pp. 447–479.
 17. Veis, A., Tsay, T.-G., and Kanwar, Y. : An immunological study of the localization of dentin phosphoporphyrins in the tooth. *INSERM*, 125 : 223–232, 1984.
 18. Fitzgerald, M. : Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J. Dent. Res.*, 58 : 2198–2206, 1979.
 19. Fitzgerald, M., Chiego, D.J., and Heys, D.R. : Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch. Oral Biol.*, 35 : 707–715, 1990.
 20. Yamamura, T., Shimono, M., Koike, H., Terao, M., Tanaka, Y., Sakai, Y., et al. : Differentiation and induction of undifferentiated mesenchymal cells in tooth and periodontal tissue during wound healing and regeneration. *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, 21 : 181–222, 1980.
 21. Thesleff, I., Partanen, A.-M., and Vainio, S. : Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis : The roles of extracellular matrix, growth factors and cell surface receptors. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 11 : 229–237, 1991.
 22. Thesleff, I., Vahtokari, A., Kettunen, P., and Aberg, T. : Epithelial-mesenchymal

- signalling during tooth development. Proceedings of the Vth international conference on tooth morphogenesis and differentiation, May 4–8, 1994, Kerkrade, The Netherlands. Woltgens, J.H.M., Bronckers, A.L.J.J., Lyaruu, D.M., editors. *Connect. Tissue Res.*, 32(1), 1995.
23. Butler, W.T. : Dentin matrix proteins and dentinogenesis. Proceedings of the Vth international conference on tooth morphogenesis and differentiation, Bronckers, A.L. J.J., Lyaruu, D.M., editors. *Connect. Tissue Res.*, 32(1), 1995.
 24. Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., and Branemark, P.-I. : A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. Oral Surg.*, 10 : 387–416, 1981.
 25. Albrektsson, T. : Direct bone anchorage of dental implants. *J. Prosthet. Dent.*, 50 : 255–261, 1983.
 26. Ingber, D., and Folkman, J. : How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*, 58 : 803–805, 1989.
 27. Narayanan, A.S., Clagett, J.A., and Page, R.C. : Effect of inflammation on the distribution of collagen type I, III, IV, and V and Type I trimer and fibronectin in human gingivae. *J. Dent. Res.*, 64 : 1111–1116, 1985.
 28. Von Recum, A.F., Optiz, H., and Wo, E. : Collagen type I and III at the implant/tissue interface. *J. Biomed. Mater. Res.*, 27 : 757–761, 1993.
 29. Burgeson, R.E., and Nimni, M.E. : Collagen types : Molecular structure and tissue distribution. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 282 : 250–272, 1991.
 30. Thesleff I., Stenman S., Vaheri A. and Timpl R. : Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Devl Biol.* 70 : 116–126, 1979.
 31. Carmichael, D.J., Chovelon, A. and Pearson, C.H. : The composition of the insoluble collagenous matrix of bovine predentine. *Calc. Tissue Res.* 17 : 263–271, 1975.
 32. Mosher, D.F. : Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *J. Biol. Chem.*, 250 : 6614–6621, 1975.
 33. Mosher, D.F. : Action of fibrin-stabilizing factor on cold-insoluble globulin and α 2-macroglobulin in clotting plasma. *J. Biol. Chem.*, 251 : 1939–1945, 1976.
 34. Bruhn, H.D., and Heimbürger, N. : Factor VIII-related antigen and cold insoluble globulin in leukemias and carcinomas. *Hæmostasis.*, 5 : 189–192, 1976.
 35. Matsuda, M., Yoshida, N., Aoki, N., and Waka bayashi, K. : Distribution cold-insoluble globulin in plasma and tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 312 : 74–92, 1978.
 36. Ali, I.U., and Hynes, R.O. : Effects of LETS glyco protein on cell motility. *Cell*, 14 : 439–446, 1978.
 37. Jilek, F., and Hormann, H. : Cold insoluble globulin (Fibronectin). IV. Affinity to soluble collagen of various types. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359 : 247–250, 1978.
 38. Grinnell, F. : The fibroblast receptor for cell-substratum adhesions : Studies on the interaction of baby hamster kidney cells with latex beads coated by cold insoluble globulin (plasma fibronectin). *J. Cell Biol.*, 86 : 104–112, 1980.
 39. Stenman, S., and Vaheri, A. : Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissue. *J. Exp. Med.*, 147 : 1054–1064, 1978.
 40. Hook, M., Rubin, K., Oldberg, A., Obrink, B., and Vaheri, A. : Cold insoluble globulin (fibronectin) mediates the adhesion of rat liver cells to plastic petri dishes. *Biochem.*

- Biophys. Res. commun., 79 : 726–733, 1977.
41. Wartiovaara, J., Stenman, S., and Vaheri, A. : Changes in expression of fibroblast surface antigen (SFA) during cytodifferentiation and heterokaryon formation. *Differentiation*, 5 : 85–89, 1976.
 42. Vracko, R. : Basal lamina scaffold anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am. J. Pathol.*, 77 : 314–338, 1974.
 43. Ruch, J.V., Lesot, H., Karcher-Djuricic, V., Meyer, J.M., and Olive, M. : Facts and hypothesis concerning the control of odontoblast differentiation. *Differentiation*, 21 : 7–12, 1982.
 44. Mosher, D.F., and Furcht, L.T. : Fibronectin : Review of its structure and possible functions. *J. Invest. Dermatol.* 77 : 175–180, 1981.
 45. Linde, A., Johansson, S., Jonsson, R., and Jontell, M. : Localization of fibronectin during dentino genesis in rat incisor. *Archs oral Biol.*, 27 : 1069–1073, 1982.
 46. Connor, N.S., Aubin, J.E., and Melcher, A. H. : The distribution of fibronectin in rat tooth and periodontal tissues : An immunofluorescence study using monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, 32 : 565–572, 1984.
 47. Dessau, W., Sasse, J., Timpl, R., and von Der Mark, K. : Role of fibronectin and collagen types I and II in chondrocytic differentiation in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 312 : 404–405, 1978.
 48. Hassell, J.R., Pennypacker, J.P., Yamada, K.M., and Pratt, P.M. : Changes in cell surface proteins during normal and vitamin A-inhibited chondro genesis in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 312 : 406–409, 1978.
 49. Slavkin, H.C., Melnick, M., Brownell, A., Bessem, C., and Bringas, P. Jr. : Anti-fibronectin antibody mediates dentin and enamel mineralization in vitro. *J. Dent. Res.*, 60 : 402, Special issue A, 1981.
 50. Thesleff, I., Barrach, J.H., Foidart, J.M., Vaheri, A., Pratt, R.M., and Martin, G.R. : Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, pro-teoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev. Biol.*, 81 : 182–192, 1981.
 51. Buser, D., Warrer, K., Karring, T., and Stich, H. : Titanium implants with a true periodontal ligament : An alternative to osseointegrated implants : *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 5 : 113–116, 1990.
 52. Chehroudi, B., Gould, T.R.L., and Brunette, D.M. : Effects of a grooved epoxy substratum on epithelial cell behavior in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.*, 22 : 459–473, 1988.
 53. Chehroudi, B., Gould, T.R.L., and Brunette, D.M. : Effects of a grooved titanium-coated implant surface on epithelial cell behavior in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.*, 23 : 1067–1085, 1989.
 54. Yamada, K.M., Akiyama, S.K., Hasegawa, T., Hasegawa, E., Humphries, M.J., Kennedy, D.W., Nagata, K., Urushihara, H., Olden, K., and Chen, W-T. : Recent advances in research on fibronectin and other cell attachment proteins. *J. Cell Biochem.*, 28 : 79–97, 1985.
 55. Hay, E.D. : Cell-matrix interaction in the embryo : Cell shape, cell surface, cell skeletons, and their role in differentiation, *The Role of Extracellular Matrix in Development*, Trelstad, R.L., New York, Alan R. Liss Inc., 1984.
 56. Scott, D.M., Murray, J.C., and Barnes, M.J. : Investigation of the attachment of bovine corneal endosteal cells to collagens and other components of the subendothelium. *Exp. Cell Res.*, 144 : 472–478, 1983.

57. Couchman, J.R., Hook, M., Rees, D.A., and
Timpl, R. : Adhesion, growth, and matrix

production by fibroblasts on laminin sub-
strates. *J. Cell Biol.*, 96 : 177–187, 1983.