

구강점막 상피세포에 부착하는 타액 성분

서울대학교 치과대학 구강내과·진단학 교실

고 홍 섭

목 차

- I. 서 론
- II. 연구내용 및 방법
- III. 결 과
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

I. 서 론

타액으로부터 유래된 pellicle이 구강내 표면에서 미생물의 집락 형성(colonization) 및 조절(modulation)에 중요한 역할을 한다는 데는 이견이 없다¹⁻⁴⁾. Pellicle은 타액 단백질 혹은 당단백질로 구성되어 있다고 보고되고 있고, 현재 pellicle 형성과 그 기능에 관한 정보는 대부분 치아 법랑질 pellicle의 연구로부터 이루어진 것이며, 미생물 집락형성 및 치면 재석회화와의 관련성이 주종을 이루고 있다⁵⁻⁸⁾. 또, pellicle은 구강내 세균 표면 뿐만 아니라 치과용 재료 표면에도 발견되며 구강내 모든 표면에 존재할 것으로 생각된다⁹⁻¹¹⁾. Bradway 등¹²⁾이 법랑질 pellicle의 개념을 구강점막에 적용하여 mucosal pellicle을 보고하였고, 구강점막 상피세포와 타액분자와의 공유결합 가능성을 제시한 바 있으며, 추가 연구에서 구강점막 상피세포에 부착할 가능성이 있는 타액 성분을 제시한 바 있다¹³⁾. 하지만 구강점

막은 부위에 따라 개별 주 타액선에서 분비되는 타액에 대한 접근도(accessibility)가 다를 수 있고, 구강점막에 넓게 퍼져 있는 소 타액선은 부위 별로 분비하는 단백질의 조성이 다르므로^{14,15)}, 구강점막 부위별로 부착하는 타액 단백질의 성분은 차이가 있을 수 있을 것이다.

본 연구의 목적은 다양한 부위의 구강점막 표면에 부착하는 주요 타액성분을 파악함으로써 구강점막의 부위별로 mucosal pellicle의 특성을 조사하는데 있다. 위의 정보를 향후 인공타액의 개발이나 구강내 약물 투여시 carrier 물질의 개발에 활용하고자 한다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 구강점막 상피세포의 수거와 상피세포로부터 단백질의 추출

부위별 구강점막 상피세포의 수거는 오전 8시경 연구대상이 아침식사와 양치질을 하지 않은 상태에서 시행하였다. 우선 연구대상으로 하여금 증류수로 입안을 세 차례 양치하게 한 직후 무딘 금속 spatula를 사용하여 해당 부위(협부, 순부, 구개부) 구강점막을 긁어 채취하였다. 채취한 상피세포를 타액과 pH 및 이온강도를 유사하게 만든 4℃ simulated salivary buffer (0.021M-Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.3, containing 36mM NaCl and 0.96mM CaCl₂)에 모은 다음, 같은 용액에서 vortex와 원심분리(13,000xg에서

각 5분)를 3번 반복하여 잔존 타액을 세척하였다. 이때 약 1×10^6 cells을 1.5ml simulated salivary buffer에 채취하였다. 이후 원심분리된 cell pellet을 1% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함하고 있는 증류수 $50\mu\text{l}$ 에 resuspend 하여 단백질을 추출하였다. 이후 동량의 solubilizing buffer(0.125M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 4% SDS, 20% glycerol, and 10% 2-mercaptoethanol)를 이용하여 1:1로 희석한 다음 5분간 boiling하여 전기영동시 시료로 사용하였다. 다음으로는 같은 방법으로 상피세포를 채취한 다음, 3회 세척후 원심분리된 cell pellet을 1% SDS를 포함하고 있는 증류수 $50\mu\text{l}$ 에 30초간 resuspend 하여 단백질을 추출한 후 즉시 원심분리하여 상층액만을 solubilizing buffer와 1:1로 희석하여 시료로 사용하였다.

2. 전기영동 및 Immunoblotting

SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였으며¹⁶⁾, 본 연구에서 관찰하고자 하는 타액내 단백질의 분자량을 고려하여 10% gel을 사용하였다. 전기영동은 Hoefer SE 280 Tall Mighty Small Electrophoresis unit(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA)를 사용하여 시행하였다. 전기영동 후, gel은 0.25% Coomassie brilliant blue in methanol/acetic acid/water(4/1/5;v/v/v)를 사용하여 염색하였고 methanol/acetic acid/water(1/1/8;v/v/v)를 사용하여 destaining하였다. Western transfer는 Towbin 등¹⁷⁾과 Burnett¹⁸⁾의 방법에 따라 시행하였다. Tris-glycine buffer(25mM Tris, 0.192M glycine, 20% methanol)를 transfer buffer로 이용하여 semi-dry blot 기기(Fisher SDB 2020, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)로 blotting한 다음, Immobilon-P(polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane; Millipore Corp., Bedford, MA, USA)를 3% BSA(bovine serum albumin)를 포함하고 있는 Tris-buffered saline(TBS) buffer(0.01M Tris-HCl, 0.154M

NaCl, pH 7.5)에 1시간 이상 incubation하였다. 이후 일차항체로서 rabbit anti-human MG1 polyclonal antibody, rabbit anti-human MG2 polyclonal antibody, rabbit anti-human PRPs (proline-rich proteins) polyclonal antibody, rabbit anti-human amylase polyclonal antibody (이상의 항체는 Buffalo 뉴욕주립대학 구강생물학과의 Dr. Michael J. Levine이 제공하여줌), rabbit anti-human IgA polyclonal antibody(α -chain specific, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각각 1:1,000으로 희석하여 incubation하였다. 이후 0.1% Tween 20을 포함하고 있는 TBS로 각 5분씩 3회 세척하고 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 이차항체를 1:2,500으로 희석하여 incubation한 후, NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) alkaline phosphatase color developing reagents(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 발색 반응시켰다. 이때 positive control로는 해당 단백질이나 당단백질을 포함하고 있는 타액을 사용하였다. Negative control로는 rabbit preimmune sera를 일차항체로 사용하였으며 그 외의 과정은 동일하게 시행하였다.

III. 결 과

Fig. 1은 협점막 상피세포 추출 단백질(lane c)과 약 30초의 제한된 시간내에 추출한 협점막 상피세포 추출 단백질(lane d)을 악하선-설하선 혼합타액(lane a) 및 이하선 타액(lane b)과 비교한 것이다. 수십 종류의 단백질 중에서 67-43kDa 사이의 두 band와 43-30kDa 사이의 band, 20-14kDa 사이의 band가 가장 뚜렷하였다. 이 중에서 타액 단백질의 여부를 알아보기 위한 immunoblotting 실험을 위해서는 제한된 시간내에 추출한 협점막 상피세포 추출 단백질(lane d)을 이용하였다. 이는 협점막 상피세포 추출 단백질(lane c)을 시료로 이용한 경우 너무나 많은 cross reactivity가 나타나 결과의 해석을 어렵게

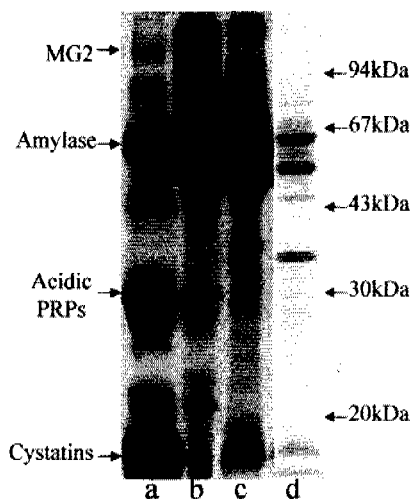


Fig. 1. SDS-10%PAGE of human submandibular-sublingual saliva(HSMSL)(lane a), human parotid saliva(HPS)(lane b), extracts of buccal epithelial cells(lane c), and extracts of buccal epithelial cells extracted during limited time(lane d).

하였기 때문이다. Immunoblotting 결과를 보면 (Fig. 2) anti-MG1은 30kDa 이하의 저분자 물질과 반응을 보였고(lane b), anti-MG2는 원래 MG2 위치와 수 종류의 저분자 물질과 반응을 보였으며 원래 MG2 위치의 반응은 미약하였다(lane d). Anti-amylase는 원래 위치에서 미약한 양성 반응을 보였고(lane f), anti-IgA는 원래 위치와 저 분자 및 고분자 물질 부위에서 각각 미약한 양성 반응을 보였다(lane h). Anti-PRPs는 넓은 부위에 걸쳐 양성 반응을 보였다(lane j).

Fig. 3은 30초의 제한된 시간내에 추출한 협점막 상피세포 추출 단백질(lane a), 순점막 추출 단백질(lane b), 구개점막 추출 단백질(lane c)을 비교한 것이다. 이 경우 부위에 따른 뚜렷한 차이를 발견할 수는 없었다. 구강점막과 공유결합의 가능성이 제시된 MG2 및 PRPs가 부위별 상피세포와 결합하는 양상도 역시 부위에 따라 큰 차이를 발견할 수 없었으나, anti-MG2가 순속점막 상피세포 추출 단백질 중 94-67kDa에 좀 더 강한 반응을 보였다(Fig. 4, 5).

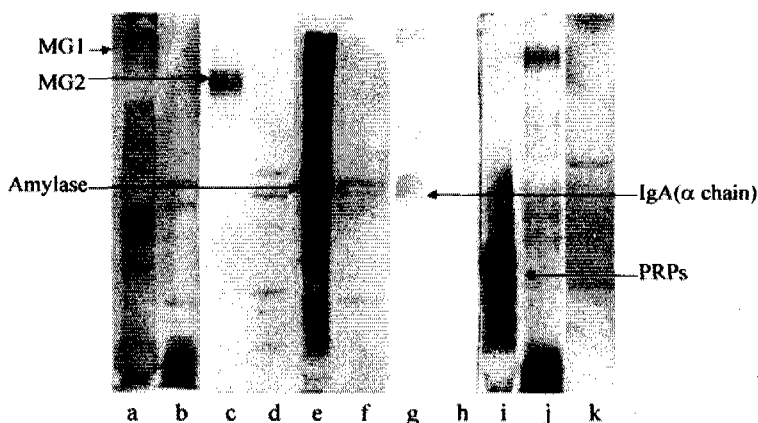


Fig. 2. SDS-10%PAGE/Western transfer probed with rabbit anti-MG1 sera(a 1:1,000 dilution): human submandibular-sublingual saliva(HSMSL)(lane a), extracts of buccal epithelial cells(lane b). Probed with rabbit anti-MG2 sera(a 1:1,000 dilution): HSMSL(lane c), extracts of buccal epithelial cells(lane d). Probed with rabbit anti-amylase sera(a 1:1,000 dilution): HSMSL(lane e), extracts of buccal epithelial cells(lane f). Probed with rabbit anti-IgA sera(a 1:1,000 dilution): HSMSL(lane g), extracts of buccal epithelial cells(lane h). Probed with rabbit anti-PRPs sera(a 1:1,000 dilution): HSMSL(lane i), extracts of buccal epithelial cells(lane j). Probed with rabbit preimmune sera: extracts of buccal epithelial cells(negative control, lane k).

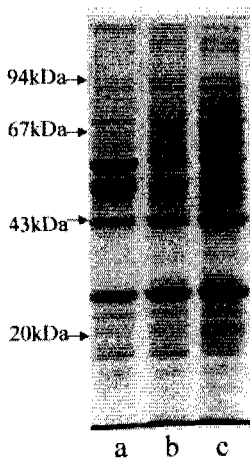


Fig. 3. SDS-10%PAGE of extracts of buccal (lane a), labial(lane b), and palatal epithelial cells(lane c).

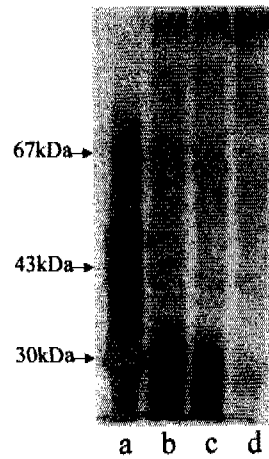


Fig. 5. SDS-10%PAGE/Western transfer probed with rabbit anti-PRPs sera(a 1:1,000 dilution). Human submandibular-sublingual saliva(lane a), extracts of buccal(lane b), labial(lane c), and palatal epithelial cells(lane d).

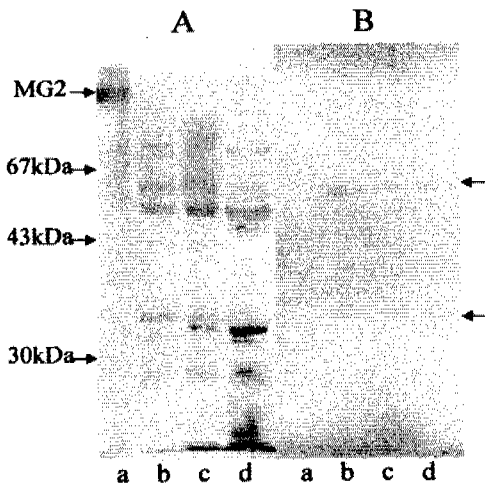


Fig. 4. Panel A) SDS-10%PAGE/Western transfer probed with rabbit anti-MG2 sera(a 1:1,000 dilution). Panel B) Negative controls probed with rabbit preimmune sera. In all panels: human submandibular-sublingual saliva(lane a), extracts of buccal(lane b), labial(lane c), and palatal epithelial cells(lane d).

IV. 총괄 및 고찰

구강점막 표면에 부착되는 타액성분에 대한 이해는 크게 두가지 측면에서 중요도를 가지고 있다. 우선 노령 인구의 증가로 인해 증가일로에 있는 구강건조증에 대한 보다 깊은 이해를 가능하게 하는 측면과 둘째로는 구강건조증을 포함한 다양한 구강질환의 치료법의 개발 측면이다. 구강건조 느낌은 자극시 분비되는 타액의 분비율의 감소보다는 비자극시 분비되는 타액 분비율의 감소와 더 큰 관련성이 있으며¹⁹⁾, 구강건조 느낌이 타액 분비율보다는 타액의 질(quality, 예를 들어 특정 성분의 변화)과 더 큰 관련이 있을 것이라는 보고²⁰⁾가 있다. 구강내에는 적은 양(0.24-0.77ml)의 잔존 타액(residual saliva)이 존재한다고 보고되고 있는데²¹⁾, 이러한 적은 양의 잔존 타액은 경조직과 연조직에 부착되어 구강점막을 습하게 만들고 구강건조 느낌을 막아 줄 것이다. 이와 같은 여러 보고를 종합해 보면 장액성(serous)보다는 점액성(mucous)의 매우 적

은 양의 타액이나 타액내의 특정 성분이 구강 건조 느낌을 막는데 매우 중요한 역할을 한다고 생각되며, 이러한 사실은 넓은 구강점막에 분포해서 점액성 타액을 분비하는 구강내 소타액선의 생리학적 중요성을 알 수 있게 해 준다.

이와 같이 적은 양의 점액성 타액이 구강건조증 해소에 결정적인 역할을 할 가능성이 있다는 연구 보고²¹⁾를 고려해 볼 때, 구강점막 표면에 선택적으로 부착하는 타액성분을 알아보는 것은 중요한 임상적 의미를 가진다. Bradway 등¹³⁾은 구강 협점막에 부착될 가능성이 있는 타액 성분을 제시한 바 있으며, 그중 mucins(MG1, MG2)와 PRPs의 중요성을 주장하였다. 특히, PRPs는 high-molecular-mass complexes로 cross-link 될 가능성이 있음을 보고한 바 있으며, 이 과정에서 상피세포의 transglutaminase가 중요한 역할을 할 것이라는 것을 암시한 바 있다. 본 연구 결과에 의하면 anti-MG2, anti-amylase, anti-IgA는 약 30초의 제한된 시간내에 추출한 협점막 상피세포 추출 단백질 중 원래 위치에서 양성 반응을 보였으며, anti-MG1, anti-MG2, anti-IgA는 해당 물질보다는 저분자 물질과, anti-IgA, anti-PRPs는 고분자 물질과 양성 반응을 보였다.

구강점막에 분포하는 소타액선은 부위에 따라 분비하는 타액 성분에 차이가 있을 수 있을 것이다. Cohen 등¹⁴⁾과 Nielsen 등¹⁵⁾의 연구 결과를 보면 구순부 소타액선은 MG1과 MG2를 다 분비하는데 비해 구개부 소타액선은 MG2를 분비하지 않는다는 사실을 알 수 있다. 이러한 연구 결과는 구강점막 각 부위별로 부착하는 단백질의 상대적 분포도가 다를 수 있다는 사실을 암시해 준다. 본 연구 결과에 의하면 30초의 제한된 시간내에 추출한 협점막, 순점막, 구개점막 상피세포 추출 단백질 사이에 뚜렷한 차이를 발견할 수는 없었다. 구강점막과 공유결합의 가능성이 제시된 MG2 및 PRPs가 부위별 상피세포와 결합하는 양상도 역시 부위에 따라 큰 차이를 발견할 수 없었으나, anti-MG2가 순측점막 상피세포 추출 단백질 중 94-67kDa에 좀 더 강한 반응을 보였다. 이는 순측점막에 분포하는 소타액선이 MG2를 주로 분비하기 때문에 나타난 현상이라

고 생각된다.

구강점막에 부착하는 타액 성분에 대한 이해는 구강건조증을 포함하여 구강내에 빈발하는 다양한 질환을 치료할 수 있는 약물의 개발에 필요한 지식을 제공해 준다. 구강점막질환의 치료시 사용되는 국소도포성 치료제의 가장 큰 약점은 약물의 짧은 구강내 잔존시간(low substantivity)과 구강표면 부위에 따른 낮은 선택성(low selectivity)이라고 할 수 있다. 본 연구 결과와 같이 구강점막부위에 상관없이 mucins, IgA, PRPs가 low-molecular-mass products로 분해된 상태로 혹은 high-molecular-mass complexes로 cross-link 될 가능성이 있다는 사실은 이러한 물질을 응용한 약물이나 carrier 물질의 개발 가능성을 암시해 준다.

본 연구는 궁극적으로 구강점막에 선택적으로 많은 양의 특정 약물이나 항세균 혹은 항진균 타액 단백질의 delivery를 가능하게 하는 물질의 개발을 위한 일련의 연구 중 초기 연구이다. 이러한 물질은 여러 난치성 구강점막 및 구강건조증의 치료를 위해 사용할 수 있을 것이며, 구강점막질환 치료를 위해 사용되고 있는 기존 약물의 최대 문제점인 약물의 짧은 구강내 잔존시간과 특정 구강표면에 대한 낮은 선택성 문제를 해결하는데 도움이 될 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 협점막 상피세포에 부착 가능성이 있는 타액 단백질을 알아보고, 이중 중요한 역할을 하리라 생각되는 MG2 및 PRPs의 구강점막 부착 양상을 구강점막 부위별로 관찰하였다. 특정 항체와 immunoblotting을 사용하여 조사한 결과, MG1, MG2, amylase, IgA, PRPs가 양성 반응을 보였으며, MG1, MG2, IgA, PRPs가 적은 분자물질로 분해되어 있을 가능성과, IgA, PRPs가 고분자 물질로 link 되어 있을 가능성이 제시되었다. 이중 MG2와 PRPs의 부착 양상을 협점막, 순점막, 구개점막에서 관찰한 결과 구강점막 부위에 따른 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다.

참 고 문 헌

1. Levine, M.J., Reddy, M.S., Tabak, L.A., Loomis, R.E., Bergey, E.J., Jones, P.C., Cohen, R.E., Stinson, M.W., and Al-Hashimi, I. : Structural aspects of salivary glycoproteins. *J. Dent. Res.*, 66:436-441, 1987.
2. Mandel, I.D. : The functions of saliva. *J. Dent. Res.*, 66:623-627, 1987.
3. Sreebny, L.M. and Broich, G. : Xerostomia(dry mouth). In Sreebny, L.M., ed., *The salivary system*, Boca Raton, 1987, CRC press, Inc., pp 179-202.
4. Tabak, L.A. and Bowen, W.H. : Roles of saliva(pellicle), diet, and nutrition on plaque formation. *J. Dent. Res.*, 68:1560-1566, 1989.
5. Moreno, E.C. and Zahradnik, R.T. : Demineralization and remineralization of dental enamel. *J. Dent. Res.*, 58:896-902, 1979.
6. Rolla, G. : Pellicle formation. In Lazzari, E.P., ed., *Handbook of experimental aspects of oral biochemistry*, Boca Raton, CRC Press Inc., 1983, pp. 245-250.
7. Al-Hashimi, I. and Levine, M.J. : Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Archs. Oral Biol.*, 34:289-295, 1989.
8. Gibbons, R.J. : Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J. Dent. Res.*, 68:750-760, 1989.
9. Douglas, C.W.I. and Russell, R.R.B. : The adsorption of human salivary components to strains of the bacterium *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.*, 29:751-757, 1984.
10. Edgerton, M. and Levine M.J. : Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J. Prosthet. Dent.*, 68:683-691, 1992.
11. Edgerton, M., Lo, S.E., and Scannapieco, F.A. : Experimental salivary pellicle formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 11:443-449, 1996.
12. Bradway, S.D., Bergey, E.J., Jones, P.C., and Levine, M.J. : Oral mucosal pellicle : Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochem. J.*, 261:887-896, 1989.
13. Bradway, S.D., Bergey, E.J., Scannapieco, F.A., Ramasubbu, N., Zawacki, S., and Levine, M.J. : Formation of salivary-mucosal pellicle : the role of transglutaminase. *Biochem. J.*, 284:557-564, 1992.
14. Cohen, R.E., Aguirre, A., Neiders, M.E., Levine, M.J., Jones, P.C., Reddy, M.S., and Harr, J.G. : Immunochemistry and immunogenicity of low molecular weight human salivary mucin. *Archs. Oral Biol.*, 36:347-356, 1991.
15. Nielsen, P.A., Bennett, E.P., Wandall, H.H., Therkildsen, M.H., Hannibal, J., and Clausen, H. : Identification of a major human high molecular weight salivary mucin(MG1) as tracheobronchial mucin MUC5B. *Glycobiology*, 7:1-7, 1997.
16. Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
17. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354, 1979.
18. Burnett, W.N. : "Western blotting." Electrophoretic transfer of proteins from sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112:195-203, 1981.
19. Osterberg, T., Landahl, S., and Hedegard, B. : Salivary flow, saliva pH and buffering capacity in 70-year old men and women. *J. Oral Rehabil.*, 11:157-170, 1984.
20. Mandel, I.D. and Wotman, S. : The salivary secretions in health and disease. *Oral Sci. Rev.*, 8:25-47, 1976.
21. Lagerlof, F. and Dawes, C. : The volume of saliva in the mouth before and after swallowing. *J. Dent. Res.*, 63:618-621, 1984.

- ABSTRACT -

Salivary Components Adsorbing to Oral Mucosal Epithelial Cells

Hong-Seop Kho, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Dept. of Oral Medicine & Oral Diagnosis, College of Dentistry, Seoul National University

The present investigation was carried out to identify salivary components of mucosal pellicle and to explore the difference of mucosal pellicle components according to the location of oral mucosa. By using antisera and immunoblotting, high-(MG1) and low-(MG2) molecular-mass salivary mucins, amylase, IgA, proline-rich proteins (PRPs) were detected in mucosal pellicle *in vivo*. In addition, the data indicated that mucins, IgA and proline-rich proteins could be cleaved into lower-molecular-mass products, whereas the IgA, proline-rich proteins could also be cross-linked into higher-molecular-mass complexes. Mucosal pellicles from buccal, labial and palatal mucosa showed similar pattern in immunoblotting experiments using anti-MG2 and anti-PRPs antisera.

The data from this study suggest that during mucosal pellicle formation multiple components of saliva adsorb to oral mucosal epithelial cell surfaces, and selected components can be proteolytically cleaved into smaller fragments and/or cross-linked into higher-molecular products.

Key words : oral mucosal pellicle, saliva