

韓牛齒齦의 酸性뮤코多糖에 關한 研究

서울대학교 齒科大學 口腔生化學教室

鄭 泰 英 · 崔 根 培 · 吳 世 潤

ACIDIC GLYCOSAMINOGLYCANS IN BOVINE GINGIVA

*Department of Oral Biochemistry College of Dentistry,
Seoul National University.*

Tai-Young Chung · Keun-Bae Choi · Sae Yoon Oh, D.D.S.

Abstract

Acidic glycosaminoglycans were isolated from the bovine gingiva and analyzed by chemical methods and by two dimensional electrophoresis on cellulose acetate strip.

The average total amount of acidic glycosaminoglycans-expressed as glucuronic acid-was 0.36% of dry gingival tissue.

By using colorimetric analysis with two dimensional electrophoresis, the distribution of dermatan sulfate was calculated to be 33% of whole acidic glycosaminoglycans, chondroitin sulfate A to be 26% and hyaluronic acid to be 38%, respectively.

I. 緒 論

齒齦의 結締組織은 주로 細胞, 組織液, 뮤코多糖 및 여러가지 纖維性要素로 構成되어 있다. 이중 細胞外基質에 存在하는 酸性뮤코多糖에 關한 組織化學的 研究結果들은 相反되는 경우도 있으나 酸性뮤코多糖에 關한 組織化學的 研究는 Holmgren (1940)¹⁾ Wislocki and Sognaes (1950)²⁾ Martens (1968)³⁾, Matthiessen (1968)⁴⁾, Ten Cate (1968)⁵⁾, Lennox & Provenza (1970)⁶⁾ 등에 依해 行하여 져왔고, 生化學的 研究는 Linde(1972, 1973)⁷⁻¹⁰⁾, Schultz-Handt(1958)¹¹⁾, Aas (1963)¹²⁾, Sakalei et al (1972)¹³⁾, 多和(1976)¹⁴⁾ 鄭 (1977)¹⁴⁾, 朴(1977)¹⁵⁾ 등에 依해 白鼠, 家兔, 豚, 犬 및 人間과 diphenyl hydantoin에 依한 比大齒齦 등을 對

象으로 施行하였으며 種에 따라 酸性뮤코多糖의 差異가 있다고 報告하였다.

著者는 本實驗에서 酸性뮤코多糖의 分布에 關한 一連의 研究로 韓牛의 齒齦에서 酸性뮤코多糖을 抽出하여 電氣泳動法으로 各分劃의 分布를 檢討하고, 化學的 分析方法으로 이들의 化學造成을 究明하여 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料 : 韓牛의 上下顎骨을 屠畜場에서 採取한 즉시 生體高分子 物質의 變性を 防止하기 위해 冷凍 시켰다가 全顎의 脣, 舌, 頰側의 齒齦을 切除하여 濕重量을 測定하였다. 그後 細切하여 Acetone을 加하여 48時間 脫水시키고 Methanol-chloroform(1:1)에 脫脂乾

燥後 乾燥重量을 測定하였다.

2. 酸性뮤코多糖의 抽出 및 分割: 脫脂乾燥된 試料를 10倍量의 증류수에 부유시켜서 100°C에서 30分間 加熱後에 NaOH로 pH 8.0이 되도록 調整하고 pronase E를 加하여 Toluen으로 封한 後 4°C에서 48時間 蛋白分解하였다. 이 過程을 再次施行後 NaOH의 終濃도가 0.5M 이 되도록 하여 37°C에서 4時間 放置하였다.

이러한 Alkali 處理後 6N HCl로 中和하여 1/3量의 40% TCA를 加하여 4°C에서 3時間 Incubation하고난 다음 遠心分離하여 얻은 上清液을 48時間 透析하였다. 그 後 35°C에서 증발濃縮하고 三倍量의 Ethanol을 加하여 4°C에서 12時間 放置한後 遠心分離하여 沈澱物을 과 Ethanol로 洗淨乾燥하여 증류수에 溶解시켜 48時間 증류수에 透析 시켰다.

그리고 冷凍乾燥하여 粗酸性뮤코多糖을 얻었다. 이 粗酸性뮤코多糖은 Cetylpyridinium chloride 複合體에서 解離溶出시키는 Schiller et al. (1961)法¹⁷⁾에 準하여 分割分離하였다.

3. 化學組成分析

1) Uronic acid의 定量; Carbazole 試藥을 利用한 Dische (1947)¹⁸⁾의 原法, Carbazole試藥을 利用한 Bitter-Muir(1961)¹⁹⁾의 變法, 그리고 Orcinol-HCl 反應의 Brown (1946)²⁰⁾法을 各各 施行하여 比色定量하였다. 標準溶液은 Glucuronic acid를 使用하였다.

2) Hexosamine의 定量: 一定量의 試料에 4N HCl 1ml를 加해 完全히 溶解封管시켜 100°C에서 16時間 加水分解한 것을 Elson-Morgan 反應의 Blix-Gardell (1948)²¹⁾變法으로 測定하였다.

3) Sulfate의 定量: 上記와 같이 加水分解된 試料의 Sulfate量을 benzidine을 利用한 Antonopolous(1962)²²⁾法으로 測定하였다.

4) Cellulose Acetate膜電氣泳動; 酸性뮤코 多糖의 同定에는 Hata와 Nagai(1972)의 一次元電氣泳動과 Seno et al(1970)²⁴⁾法에 準하였다. 二次元電氣泳動에서 첫번 泳動은 0.1M Pyridine-0.47M Formic acid buffer (pH3.0)에서 1mA/cm의 電流로 45分間 施行하였고 그 후 空氣中에서 乾燥하여 두번째 泳動은 0.1M Barium buffer (pH 8.0)에서 1mA/cm의 電流로 3時間 泳動하였다. 泳動後 acetate膜은 0.1% Alcian Blue-8GS를 含有한 3%acetic acid에서 10分間 染色하여 1% acetic acid로 脫色한 後 流水에 洗滌하였다. 標準物質로는 Hyaluronic acid (Fluka, Switzland), Chondroitin Sulfate A, B, C(生化學 工業 東京), Heparin(半井化學 京都) 등을 使用하였다.

III. 實驗結果

1. 牛齒齦의 總酸性뮤코糖量; 韓牛의 上下顎의 脣, 舌, 頰側의 齒齦에서 抽出한 酸性뮤코多糖量은 Table I에서 要約하였다. 即 齒齦組織의 乾燥重量 4.45g當 抽出한 酸性뮤코 多糖의 總量은 16.5mg이었으며 이는 glucuronic acid로 表示하면 4211.4 μ g으로서 約 0.36%를 차지 하였다.

Table I. Acidic glycosaminoglycans content in bovine gingiva

Tissue weight(g)	
wet	14.50
dry	4.45
Acidic glycosaminoglycans yields	
dry powder(mg)	16.5
μ g as glucuronic acid	4211.4
% of dry tissue	0.36%

Table II. Chemical analysis of whole acidic glycosaminoglycans from bovine gingiva.

Uronic acid	
Carbazole(%) *	26.59
Carbazole(%)**	21.70
Orcinol(%)	30.0
C/O ***	0.88
Hexosamine(%)	28.3
Sulfate(%)	5.46

* Primary carbazole reaction by DISCHE

** Modified carbazole reaction by BITTER-MUIR

*** Carbazole-orcinol ratio

Table III. Percent distribution of acidic glycosaminoglycans in the bovine gingiva.*

Chondroitin sulfate A	26.2
Dermatan sulfate	33.3
Hyaluronic acid	38.3

* Percent was calculated from the densitometric recording of electrophoregram.

2. 酸性뮤코多糖의 化學的 分析; Table II에서 보는 바와 같이 化學的 分析의 結果를 要約하였다.

Uronic acid量은 分析方法에 따라 各各 總류코多糖量의 26.6%, 21.7%, 30.0%를 차지하며, Carbazole-Orcinol ratio는 0.88 이었다.

그리고 Hexosamine과 Sulfate量은 各各 總류코多糖의 28.3%, 5.46%를 차지하였다.

3. 電氣泳動에 의한 酸性류코多糖分布; 齒齶酸性류코多糖의 cellulose膜上에서의 二次元電氣泳動像은 Fig.1에서 보는 바와같다. 즉 Hyaluronic acid와 Dermatan sulfate에 一致하는 明瞭한 spot와 Chondroitin sulfate A에 一致하는 광범위한 spot를 볼수있었다.

또한 一次元電氣泳動에서 얻은 cellulose acetate strip을 流動 paraffin으로 처리하여 Denistometry하여 얻은 結果는 Fig. 2와 Table 3에서 보는 바와 같다.

Hyaluronic acid는 Alcian blue에 對한 染色도가 硫酸化酸性류코多糖에 비해 50%程度로 弱하게 나타난다는 Gardais et al. (1969)³⁵⁾의 報告에 근거를 두어 1:2의 比로 計算하였다.

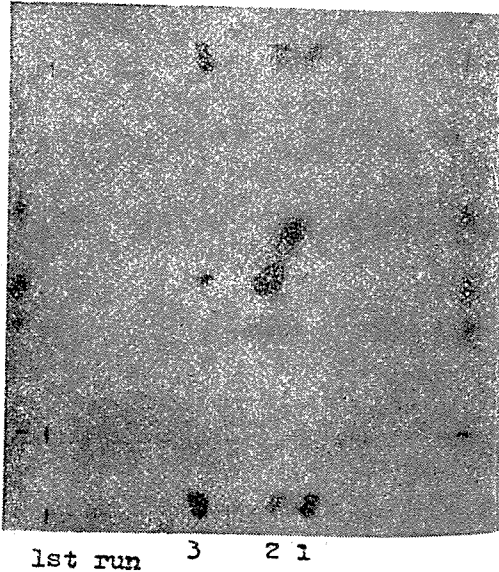


Fig.1. Two dimensional electrophorogram of acidic glycosaminoglycans in the bovine gingiva.

- Standare sample; 1. Chondroitin sulfate A
2. Dermatan sulfate
3. Hyaluronic acid
4. Heparin

Densitometric scan에 의해 推定된 定量結果는 Hyaluronic acid가 38%程度로 가장 많은 分布로 보였으며 다음으로 Dermatan sulfate가 33%程度이고 Chondroitin sulfate A가 26%로서 이 3種의 分割이 主酸性류코多糖을 이루고 있다.

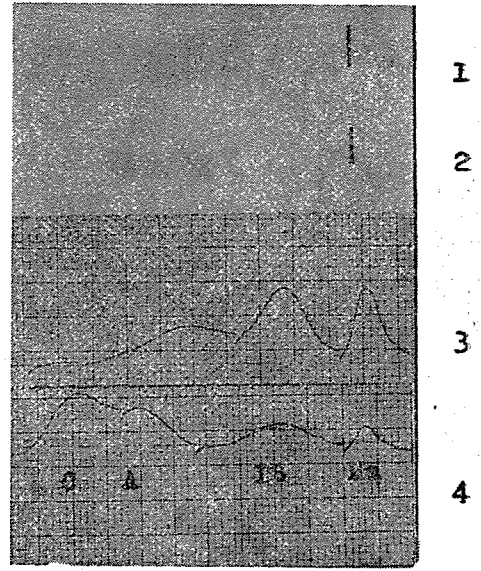


Fig.2. Densitometric scanning of electrophoretic separation of the bovine gingival acidic glycosaminoglycans.

- Abbreviation; 1. Electrophorogram of gingival samples.
2. Electrophorogram of standard samples.
3. Densitometric recording of gingival samples.
4. Densitometric recording of standard samples.
Ha; Hyaluronic acid
DS; Dermatan sulfate
A; Chondroitin sulfate A
C; Chondroitin sulfate C

Ⅲ. 考 察

本 實驗은 韓牛齒齶의 酸性류코多糖(acidic glycosaminoglycans)를 抽出하여 化學的, 電氣泳動 및 酵素分解에 의해 分子種 level에서 分割하여 比較檢討하였다.

結締組織은 生體成分으로 比較生物學的으로 볼때 대단히 分化된 高等生物에 많이 存在하고 있으며 또한 分化된 生體 여러組織의 細胞사이에서 埋立되어서 支持的으로 作用할뿐아니라 여러가지 生理機能을 가지고 있다.

이와함께 結締組織基質成分인 酸性류코多糖은 代謝物의 運搬을 調節하는 機能을 가지고 있어 細胞의 物質代謝에 깊은 關係를 맺고 있다.

齒齶組織에서도 이의 構成成分으로 存在하는 結締組織細胞 및 上皮細胞의 機能을 維持하고 調節하는데 酸性류코多糖이 중요한 役割을 한다는 것도 추측할 수 있다.

齒齶에 存在 하는 酸性류코多糖과 齒齶疾患과의 關連性

을 추구하면 이의 病態를 究明하는데 도움이 될 수 있다.

齒齦組織의 酸性뮤코多糖은 지금까지 組織化學的方法으로 많이 研究되어 왔는데, Engel et al(1953)²⁶⁾은, 齒齦結締組織의 細胞사이에서 강한 metachromatic 反應을 나타내는 物質이 水溶性이고 Testicular hyaluronioase에 의해 消化시키므로 제거할 수 있다고 報告하였고, Quintarelli(1960)²⁷⁾는 炎症性 齒齦에서 Toluidine blue에 強하게 染色되는 結締組織의 細胞間空隔 物質을 報告하였다. 또한 Thonard(1962)²⁸⁾는 齒齦上皮의 細胞間空隔이 주로 Chondroitin sulfate로 構成되어 있다고 報告하였다.

本實驗에서 Pronase로 酵素分解하여 酸性뮤코多糖을 抽出하여 얻은 結果는 齒齦乾燥重量을 基準하여 0.36%를 차지하는 반면, Ciancio (1971)²⁹⁾는 蛋白分解酵素로 抽出한 경우 사람에서 약 0.4%, Sakaki et al. (1972)³⁰⁾은 같은 方法을 써서 0.86%, 鄭(1977)³¹⁾ 역시 0.86%를 차지하였다고 했다. 이로서 韓牛의 경우 사람의 齒齦보다 더 적은 量의 酸性뮤코多糖을 含有하는 것 같다.

Hata와 Nagai (1973)³⁰⁾는 Cellulose acetate strip 上에서 二次元電氣泳動을 통한 酸性뮤코多糖의 微量分析法을 報告하였으며, 이 方法을 利用하여 Sakaki et al (1972)³⁰⁾는 사람의 齒齦에서 Chondroitin sulfate B가 主成分이며 Chondroitin sulfate A, 및 Hyaluronic acid가 다음으로 나타났으며 Heparan sulfate-like substance가 미량 존재한다고 하였다. 나아가서 鄭(1977)은 Chondroitinase AC와 ABC에 의한 酵素消化를 통하여 이 Heparan sulfate 有似物質을 Heparan sulfate로 確認하였다. 本實驗의 結果에서 본 電氣泳動像은 Chondroitin sulfate가 26.2%, Dermatan sulfate가 약 33.3%이며, Hyaluronic acid가 가장많은 38.3%로 나타났는데, 이는 他 研究者와 比較하여 약간의 差異가 있고 또한 heparan sulfate도 檢出치 못하였다. 以上과 같은 差異는 比較生物學的인 面에서 酸性뮤코多糖의 分子種과 系統發生과의 密接한 關連性에 기인한다고 보며, 따라서 酸性뮤코多糖은 結締組織의 成長과 老化, 또는 動物種에 의해 分子種 level의 變化를 인정할수가 있다³¹⁾고 볼수 있다.

細胞間基質의 主構成成分인 酸性뮤코多糖은 이의 物理化學的性質에 의해 물과 電解質의 貯留, 滲透壓의 維持와 平衡, 代謝物의 運搬등을 調節하여 生體內部環境의 恒常性維持에 主役을 담당하고 있다고 할수 있는데, 이와함께 齒齦에서의 構成酸成뮤코多糖의 變動은 齒齦組織의 機能의 維持나 調節에의 異常을 의미한다고 할수 있다. Ciancio (1971)²⁹⁾는 齒齦組織疾患이 있을 경우 Chondroitin sulfate가 減少한다고 하였고 原(1971)³²⁾은

酸性뮤코多糖異常症이 있는 Hurler症侯群에 유사한 疾患에서는 齒齦組織破壞나 腫脹을 볼 수 있다 하였다. Koford 等 (1973)³³⁾은 糖尿病이 있는 白鼠齒齦의 酸性뮤코多糖의 構成비가 變動되는 것을 報告하여 齒周疾患과 關連시켜 興味있는 意見을 보였다.

以上과 같이 韓牛齒齦에 포함된 酸性뮤코多糖이 分子種을 究明하고 他動物과 比較하였으며 齒周疾患의 病態究明에 도움이 될것이라 생각된다.

V. 結 論

本實驗에서는 韓牛齒齦으로부터 酸性뮤코多糖을 抽出하여 그의 化學的組織을 分析하였으며, Cellulose Acetate 膜電氣泳動에 의해 各 分割의 分布를 檢討하여 얻은 結果는 다음과 같다.

牛의 齒齦內 酸性뮤코多糖量은 脫脂乾燥重量을 基準으로 하여 약 0.36%를 차지한다.

韓牛齒齦組織內酸性뮤코多糖의 分子種分布는, Hyaluronic acid가 약 38%, Dermatan Sulfate가 33%이며 Chondroitin sulfate A가 26%로서 이 3種이 主 構成成分을 이루고 있다.

References

- 1) Holmagren, H.: Studien über Verberitung und Bedeutung der Bedeutung der chromotren Substanz : Z. mikroanato. Forsch. 47, 489, 1940
- 2) Wislocki, G.B. and Sognmaes, R.F. ;Histochemical reactions of normal teeth. Amer. J. Anat., 87, 239, 1950
- 3) Martens, P.; Human dentinogenesis with special regard to the formation of peri-tubular crown dentin and zones in fetal deciduous and unabraded permanent teeth. Odont. Tidskr., 76, 297, 1968
- 4) Matthiessen, M.E.: Comparative histnchemical studies on the development of teeth in man and in mouses; Acta Anat., 70, 14, 1968
- 5) Ten cate, A. R. : Current concepts and problems of dentinogenesis. In : Dentine and pulp (edited by Symons, N.B.B), pp.9-18. E & S. Livingstone, Edinburgh, 1968
- 6) Lennox, D.W. and Provenza, D.V.: Mucopolysaccharides in odontogenesis, Histo., 22, 328, 1970

- 7) Linde, A. ; Glycosaminoglycans of the porcine dental pulp: *Archs Oral Biol.*, 15, 1035, 1970
- 8) Linde A. : Glycosaminoglycans of the rat incisor pulp: *Biochem. Biophys. Acta* 279, 446, 1972
- 9) Linde, A. : Glycosaminoglycans turnover and synthesis in the rat incisor pulp: *Scans. J. Dent. Res.*, 81, 145, 1973
- 10) Linde, A. A study of the dental pulp glycosaminoglycans from permanent human teeth and rabbit incisors : *Archs Oral Biol.* 18, 49 1973
- 11) Schultz-Haude, S.D. : Observations on the acid mucopolysaccharides of human gingiva: *Odont. Tidskr.*, 66, 3, 1938
- 12) Aas, E. ; Hyperplasia gingivae diphenylhydantoinea : *Acta Odont. Scand.*, 21(Suppl. 34), 77, 1973
- 13) Sakaki, T., Tsurumi, N., Abe, et al; Isolation and characterization of acid mucopolysaccharides from human gingiva : *J. Osaka Dent. Univ.*, 6, 88, 1972
- 14) Chung, Tai-Young : Distribution of acid mucopolysaccharides in human gingiva, *Korean journal of Oral Biol.* vol. 1, No.1, 1977
- 15) Park, Woo-Chan : Distribution of acid mucopolysaccharides in bovine dental pulp : *JKDA*, Vol. 15, No.7, July, 1977
- 16) Meyer, K. Linker, A., Avidson, E.A. et al : The mucopolysaccharides of bovine cornea : *J. Biol. Chem.*, 205, 611, 1953
- 17) Schiller, S., Slover, G.A. and Dorfman, A. : A method for the separation of acid mucopolysaccharides : Its application to the isolation of heparin from the skin of rats ; *J. Biol. Chem.* 236, 983, 1971
- 18) Dische, Z. ; A new specific color reaction of hexuronic acids : *J. Biol. Chem.*, 167, 189, 1947
- 19) Bitter, T. and Muir, H.M. ; A modified uronic acid carbazole reaction : *Anal. Biochem.*, 4, 330, 1962
- 20) Brown, A.H. : Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose ; *Arch. Biochem.*, 11, 269, 1946.
- 21) Blix, G ; the determination of hexosamines according to Elson and Morgan : *Acta Chem. Scand.* 2, 467, 1948
- 22) Antonopoulos, C.A., ; A modification for the determination of sulphate in mucopolysaccharides by the benzidine method : *Acta Chem. Scand.*, 16, 1521, 1962.
- 23) Hata, R. and Nagai, Y. ; A rapid and micro-method for separation of acidic glycosaminoglycans by two-dimensional electrophoresis ; *Anal. Biochem.*, 45, 462, 1972
- 24) Seno, N., Anno, Kondo, K. et al : Improved method for electrophoretic separation and rapid quantitation of isomeric chondroitin sulfates on cellulose acetate strips : *Anal. Biochem.*, 37, 197, 1970.
- 25) Engel, M.B., Ray, H.G. and Orban, B. ; the pathogenesis of desquamative gingivitis : A disturbance of the connective tissue ground substance : *J. dent. Res.*, 29, 410, 1950
- 26) Engel, M.B. ; Water soluble mucoproteins of the gingiva ; *J. dent. Res.*, 32, 779, 1953
- 27) Quintarelli, G. ; Histochemistry of the gingiva. IV. preliminary investigations of the mucopolysaccharides of connective tissue ; *Arch. oral Biol.*, 2, 277, 1960
- 28) Thonard, J.C. and Schersp, H.W. ; Histochemical demonstration of acid mucopolysaccharides in human gingival epithelial intercellular spaces : *Arch. oral Biol*, 7, 125, 1962
- 29) Ciancio, S.G. and Mater, M.L. ; Acid mucopolysaccharides in gingivitis and periodontitis ; *J. Periodont. Res.*, 6, 188, 1971
- 30) Hata, R. and Nagai, Y. ; Distribution of acidic glycosaminoglycans in tadpole back skin ; *Biochim. Biophys. Acta*, 304, 48, 1973
- 31) 鈴木旺 ; 結合組織の素物質としてのムコ多糖タンパク複合體 分子進化, 分子分析, 生合成, 生體の科學, 19, 62, 1968
- 32) 原耕二 ; 廣瀬達男 外, 16歳の少女によられた高度の歯周症について. 13, 227, 1971
- 33) Koford, Z. A. and Tocci, A.A. ; The acidic glycosaminoglycans of gingiva of diabetic rats. *J. Periodont Res.*, 238, 3, 1973
- 34) 多和敏一, 本多忠敬, 鄭泰英外 ; 歯肉の酸性ムコ多糖に関する研究 ; *齒科醫學*. 39, 799, 1976.
- 35) Gardais, A., Picard, J. and Tarasse, C. 1969. Micro-fractionnement et micro-dosage des glycosaminoglycans par électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose gélatinisées. *J. chromatogr.* 42, 396—407.