

흰쥐 대구치의 치수강 노출 후 치유 및 형성과정에서 치수와 상아질 기질내의 교원질과 당단백의 분포에 관한 면역조직화학적 연구

경희대학교 치과대학 보존학교실

김병우 · 민병순

Abstract

FORMATION OF EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS DURING DEVELOPMENT AND REPAIR OF PERFORATION OF THE RAT DENTIN AND PULP

Byung-Wooh Kim, D. M. D., M. S. D., Byung-Soon Min, D. D. S., M. S. D., Ph. D.

*Department of Conservative Dentistry, Division of Dentistry, Graduate School,
Kyung Hee University*

The development and repair requires the formation of new tissues comprised of various extracellular matrix components. The present study investigated the formation and distribution of the major ECM components such as type I collagen, type III collagen, fibronectin, bone sialoprotein, and osteonectin during development and repair.

For developing observation, Sprague-Dawley rats weighing 27 ± 1 gm were sacrificed. For repair observation, Sprague-Dawley rats weighing 110 ± 5 gm were used. The pulp perforation were prepared on mesial surface of the maxillary first molar by using 1/2 round bur. At 5 days after perforation, rats were sacrificed by perfusion with 3% paraformaldehyde. The maxillary first molar region were cut, demineralized, dehydrated and embedded in paraffin. Immunostaining the ECM components was achieved by the avidin-biotin complex method.

The results as follows :

1. Bright immunoreaction for fibronectin was present in the basement membrane at the inner epithelial-mesenchymal interface, especially concentrated in the blood vessel walls, cell membrane of odontoblasts, and initial predentin.
2. Type I and III collagen was observed in the newly formed pulp tissue, predentin, and its intensity increased as more of these components during repair.
3. Strong immunostaining for bone sialoprotein and osteonectin was found in dentin while no or weaker staining was observed loose connective tissue of the pulp.

4. These results suggest that development and repair is achieved through a series of cell differentiation and attachment by the specific ECM components.

I. 서 론

배자(embryo)의 발생 후 여러 기관의 분화는 각 기관의 특징적인 세포 분화에 의해 이루어진다. 치아의 발육과정 역시 치아가 발생하기 위해서 치유두세포는 상아질모세포로 분화되고, 내치상피는 법랑질모세포로, 치낭의 세포들은 섬유모세포와 시멘트질모세포 및 조골세포로 분화되는데, 이러한 세포분화와 세포의 활성 없이는 치아의 발생은 이루어질 수 없다. 그러나 세포의 분화를 포함하는 일련의 변화를 세포 단독으로 관찰하여서는 그 의미를 파악할 수 없다.

즉, 미분화된 간엽세포를 특이한 세포로 적당한 시기에 분화시키는 유도인자가 있을 것이라는 추측을 할 수 있다. 따라서 세포의 변화를 관찰하는 것과 더불어 이러한 현상의 원인이 무엇인가도 연구해 보아야 할 것이다. 이러한 세포의 분화과정은 상피-간엽간의 상호작용에 의해 조절된다고 알려져 있으며, 이때 세포외기질은 필수요소인 것으로 알려져 있다. 즉 상피세포와 간엽세포는 반드시 서로 접촉관계를 유지하고 있는데¹⁾, Thesleff 등²⁾은 간엽세포가 상아질모세포로 분화하는 데는 기저막이 직접 관여한다고 하였으며, 또 분화된 상아질모세포가 분비하는, 상아질의 기질인 전상아질은 치아기의 내치상피세포가 법랑질모세포로 분화하는데 관여한다고 알려져 있다³⁾. 정상적인 치아의 발육과정 중에서 여러 가지 세포외기질성분의 변화가 나타나는데, 치아의 발육이나 치유과정을 알기 위하여 기질의 변화를 우선 이해하는 것이 필요하다. 기질 단백질의 조성변화를 관찰하여 치아를 분화시키고 발육시키는 원인이 어떠한 기전으로 세포의 분화를 포함하는 일련의 발육 및 치유과정의 원인인지 그 가능성은 알 수 있다고 생각한다.

교원질은 인체의 결합조직 중 가장 많은 부분을 차지하는 단백질로서, 다양한 형태로 존재하

게 된다. 그 중 치아기를 포함하는 조직에서는 제1형, 제3형 및 제4형 교원질이 모두 발견되고 있으며 이 중 제4형 교원질은 기저막에서만 특이하게 발견되고, 주로 기저막의 구조를 유지하는 역할을 하는 것으로⁴⁾, 치아형성에 중요한 역할을 하는 치유두 및 치낭에서는 제1형 및 제3형 교원질이 나타난다. 제3형 교원질은 배자의 신생 조직에서 특징적으로 나타나는 교원질로서⁵⁾, 치아 및 주위조직에서는 비교적 적은 양이 분포되며, 간엽세포가 분화됨에 따라 그 양이 줄어드는 것으로 알려져 있다.

교원질에 부가하여, 최종적으로 분화된 상아질모세포는 상아질 세포외기질 속으로 몇 가지 비교원성 단백질을 합성, 분비한다⁶⁾. 상아질의 주요 비교원성 단백질 중 하나는 bone sialoprotein (BSP)이며, 상아질형성시의 면역조직학적 연구에서 BSP는 석회화 초기단계에 그의 세포질돌기를 통하여 단백질을 수송하는 것으로 나타난 상아질모세포가 생산, 분비된다⁷⁾. 최근 rat BSP cDNA 전체가 만들어져 BSP가 추출되었다⁸⁾. 즉 유전자에 대한 mRNA 전사(transcripts)는 일차 상아질 형성에서 관련된 상아질모세포 안에서만 관찰되었다. 비록 상아기질의 형성과정에서 BSP의 역할은 정확히 알려져 있지 않지만 상아질을 형성하는데 필수적인 당단백으로 알려져 있다.

osteonectin(ON)은 분자량이 32 kDa인 인산화 당단백질로서 주로 발육중인 골의 무기성분에 존재하는 당단백으로⁹⁾ 석회화조직에서의 ON의 기능은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만, 시험관에서 교원섬유 위에 수산화인회석 형성 개시기에 많이 분포되며, 교원세섬유와 칼슘에 부착된다고 보고하였다¹⁰⁾. 선행들의 연구에서 ON은 급속히 개조되는 조직에서는 경조직과 연조직 모두에서 분포되고¹¹⁾, 여러 세포에 의하여 합성, 분비된다고 하였다¹²⁾.

fibronectin(FN)은 조직과 혈액에 분포하는 고

분자량 당단백의 한 종류로서 이것은 세포외기질 성분과 중간엽세포를 증가한다. 발육과 치유과정에서 FN의 세포부착, 세포이동, 세포분화시 FN의 역할에 대해서는 잘 알려져 왔으며¹³⁾ 치아 발육시 내법랑상피 아래의 외배엽성 중간엽세포들이 분화되어 전상아질을 만든다. 상아질모세포의 분화에서 FN의 역할은 면역형광법과 면역세포화학법에 의해 밝혀져 왔다. 상아질모세포를 형성하는 치유두의 세포들은 FN으로 둘러싸여 있고, FN 수용체(a 145-165-185-kDa complex)가 세포막에 존재하고¹⁴⁾ 상아질모세포의 분화시 세포표면 FN은 세포들끼리 주변에 국한된다¹⁵⁾. 이 부착성 당단백의 재분포는 세포의 FN과 세포내 미세섬유 사이의 상호작용으로 형태와 극성을 조절하는 FN 표면수용체(surface-receptors)의 축적을 일으킨다¹⁶⁾.

상아질형성은 노출된 치수조직의 절단 혹은 원래 상아질모세포의 파괴 후 치수 치유과정에서도 이차적으로 발생할 수 있다¹⁷⁾. 상아질모세포의 재발생은 법랑상피와 기저막이 없음에도 불구하고 분화되며 새로운 상아질모세포의 극성과 전상아질의 분비를 조절하는 기전은 의문으로 남는다. 최근 in vivo 연구에서 일차상아질과 관련된 여러 단백질과 기질상아질 유도성질이 밝혀졌으며¹⁸⁻²⁰⁾ 상아질모세포양세포가 상아질단백질을 도포한 Millipore 여과지 위에 치유두 외배엽성 중간엽의 배양결과로 확인되었다²¹⁾.

새로운 상아질모세포 분화시 FN의 역할에 대하여 Veron 등²²⁾과 Seux 등²³⁾이 보고 하였으며, Veis²⁴⁾의 연구에서는 FN을 매개로 한 치수세포의 부착은 새로운 상아질모세포의 분화를 조절하는 당단백으로 작용한다고 주장하였다.

이상의 선행들의 연구를 살펴보면 동일한 기관과 조직 사이에서도 교원질과 당단백의 분포가 일정하지 않고 개체 및 연령 특히 조직의 상태에 따라 상당한 분포정도의 차이가 나타나고 있다. 특히 상아질과 치수에서 이들 단백질의 분포 및 작용에 관한 연구는 희소하고 또 대체로 치유과정에서의 분포 및 역할에 대한 연구는 미진한 실정이다.

최근 연구에서 일차상아질 형성시 상아질모세

포의 분화와 역할을 조절하는 분자생물학적 방법이 이용되고 있지만, 이차상아질 형성을 유도하는 기전에 관해서는 밝혀진 바 없다. 이차상아질의 형성은 만성 치아우식증 및 보존치료 과정과 수복재료 등에 반응하여, 상아세관 하방에 상아질-치수 complex에서 침착된다. 이 연구는 일차로 일차상아질 형성시에 제1형 및 제3형 교원질에 대한 분포와 상아질모세포의 분화시 유용한 당단백으로서의 BSP, ON 및 FN 항체를 이용하여 먼저 분포 및 그 예상되는 역할을 알아보고, 이차로 이차상아질에서 나타나는 이들 단백질의 분포를 연구하기 위하여 발육중인 흰쥐 치아의 치수강을 노출 후 치배에서의 상아질과 치수의 발육 기전의 관련성을 규명하고 치수와 상아질의 치유 및 재생 과정에서 교원질과 당단백의 분포와 역할을 면역조직화학적으로 관찰하여 다소의 지견을 얻어 발표하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

교원질 및 각 당단백의 분포와 치배 발육과정을 관찰하기 위하여 실험동물로는 동일한 조건 하에서 사육된 생후 14일된 웅성 Sprague Dawley계 흰쥐 (체중 $27 \pm 1g$)를 각 10마리씩을 사용하였다. 이 시기의 흰쥐 상악 제 1대구치의 치배는 대부분의 치아 경조직이 형성되고 있는 단계로, 특히 Hertwig 상피근초를 따라서 다양한 분화시기에 있는 상아질모세포를 관찰할 수 있으며, Hertwig 상피근초의 기저막의 파괴나 시멘트질모세포의 분화, 치주인대의 형성과정 등 치근의 발육과정을 용이하게 관찰할 수 있다.

치유과정을 관찰하기 위해서 체중 110gm내의 웅성 Sprague Dawley계 흰쥐를 교원질 및 각 당단백당 10마리씩 사용하여 1/2 round bur로 상악 제1대구치 근심면에서 치수강을 천공시켜 5일 후에 희생시켰다.

2. 실험방법

1) 치배 발육과정의 면역조직화학적 관찰

치배 발육과정을 관찰하기 위하여 면역조직화학적 방법으로 avidin-biotin conjugate (ABC) 법을 사용하여 면역염색을 시행하였으며, 일차항체로는 흰쥐의 제1형 및 제3형 교원질과 FN을 토끼에 배양하여 얻은 anti-type I, type III collagen antibody와 anti-fibronectin antibody (Chemicon international Inc., USA)를 사용하였고, 이차항체 및 avidin-biotin reagent는 Vectastain Elite ABC kit (Vector laboratories, USA)를 사용하였다.

각 실험동물을 ethyl ether로 흡입마취시킨 후 10% 중성 완충 formalin (pH 7.0)으로 심장을 통하여 전신관류고정한 후 대구치 치배를 포함하여 상악골을 절취, 동일한 용액에 4시간 추가 고정한 후 구강점막 이외의 불필요한 연조직을 제거하고, 0.1M 인산완충용액 (pH 7.4)으로 30분간 수세하여 0.1M 인산완충용액에 희석한 10% EDTA (pH 7.4)로 4°C에서 7일간 탈회하였다.

일련의 ethanol로 탈수한 후 xylene을 거쳐 파라핀으로 포매하여 박절기 (Reichert-Jung, 2050 Supercut, West Germany)로 5 μ m의 절편을 제작하였다.

조직절편의 파라핀을 xylene으로 제거하고, 일련의 ethanol과 증류수로 각 5분씩 재흡수시켰다. 과산화효소는 일반조직 내에도 존재할 가능성이 있는데, 이 실험에서 사용하는 방법에서는 과산화효소가 발색을 일으키는 효소로 사용되므로, 내재성 과산화효소를 방지할 경우 가양성반응이 나타나게 된다. 따라서 이러한 내재성 과산화효소를 불활성화시키기 위해 methanol에 희석한 0.3% H₂O₂로 실온에서 30분간 처리한 후, 0.01M 인산완충식염수 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2)로 10분씩 2회 수세하였다. 비특이적 반응을 방지하기 위하여 goat 정상혈청으로 20분간 반응시킨 후 여분의 혈청을 제거하고 내고, 절편에 일차항체로서 흰쥐의 제1형 및 제3형 교원질과 FN을 토끼에 배양하여 얻은 anti-type I, type III collagen antibody와 anti-fibronectin antibody를 PBS로 각각 적당한 농도

로 희석하여 적용시킨 후, 조직절편이 건조되지 않도록 습도를 유지한 상태로 실온에서 2시간 반응시켰다. 이 때 음성대조군에는 일차항체 대신 0.01M PBS를 반응시켰다.

조직절편을 0.01M PBS로 5분씩 2회 수세한 후, 이차항체로서 biotin을 결합시킨 goat anti-rabbit IgG를 적용하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.01M PBS로 5분씩 2회 수세 후 avidin-biotin conjugate reagent로 실온에서 30분간 적용시켰다. 절편을 0.01M PBS로 5분간 수세하고, 마지막으로 0.1M Tris buffer (pH 7.2)에 녹인 0.1% DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride)용액과 0.02% H₂O₂를 동량으로 섞은 용액을 적용시켜 암조건에서 5분간 반응시켰다. 그 후 slide를 흐르는 증류수로 10분간 수세하고, 필요한 경우 Mayer's hematoxylin으로 3분간 대조염색하여 NH₃·H₂O(암모니아수)로 처리한 후 수용성 봉입제인 Glycerol Gelatin (Sigma Diagnostics, USA)으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2) 치수강 노출 후 치유과정의 조직학적 관찰

각 실험동물을 ethyl ether로 흡입마취시킨 후 10% 중성 완충 formalin (pH 7.0)으로 심장을 통하여 전신관류고정한 후 대구치 부를 포함 상악골을 절취, 같은 용액에 4시간 추가 고정하였다.

그 후 구강점막 이외의 불필요한 연조직을 제거하고, 0.1M 인산완충용액 (pH 7.4)으로 30분간 수세하여 0.1M 인산완충용액에 희석시킨 10% EDTA (pH 7.4)로 4°C에서 7일간 탈회하였다.

일련의 ethanol로 탈수한 후 propylene oxide를 거쳐 Epon으로 포매 박절기 (Reichert-Jung, 2050 Supercut, West Germany)로 1 μ m의 준박절편을 제작하였다.

조직절편을 건조시킨 후 1% alkaline toluidine blue 용액을 절편에 떨어뜨려 염색하여 따뜻한 물로 남은 염색액을 세척한 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 실험 성적

1. 세포분화와 이동

치아발육시기에 아직 치근 상아질이 형성되지 않은 경우 치아기의 내치상피와 외치상피에서 유래된 상피근초가 뚜렷하게 두층의 세포와 그 외면에 기저막으로 구성되어 있었다. 내치상피에 인접한 치유두의 외배엽성 간엽세포는 전형적인 간엽세포의 형태인 별모양의 세포로 구성되어 있었으며, 이들 세포들은 상피근초쪽으로 방향성을 가지고 이동하고 있는 모습이 관찰되었다 (Fig. 1).

제1형 교원질의 분포는 상피근초에 인접한 치유두의 세포외기질에서 강한 분포를 보였으나 상피근초에서는 분포되지 않았다 (Fig. 2).

제3형 교원질의 분포도 제1형과 비슷한 소견이었으나 치유두 기질에서는 분포가 관찰되었다 (Fig. 3).

FN의 분포는 인접한 치유두 세포외기질에서 섬유형태로 강하게 염색되었고, 특히 상피근초 안쪽 기저막을 따라 강하게 분포되어 치유두내의 세포분화와 이동에 가장 밀접한 역할을 하고 있었다 (Fig. 4).

이 시기의 BSP의 분포는 치유두내의 미분화 세포와 세포외기질 뿐만 아니라 상피근초에서는 반응을 보이지 않았으며 (Fig. 5), ON 역시 거의 반응이 없었지만 BSP보다는 간엽세포 사이의 기질에서 미약한 반응을 보였다 (Fig. 6).

2. 세포의 부착과 증식

연결되어 있던 상피근초의 연결성이 파괴되고 치유두 간엽세포가 이동되면서 상아질모세포로 분화되어 상피근초 내측에 부착 상아질모세포층을 이루어 상아기질이 형성되고 있었다 (Fig. 7).

제1형 교원질은 상아질모세포층에서는 분포되지 않았으나, 세포가 부착하고 있는 전상아질에서는 분포되어 있었다 (Fig. 8).

제3형 교원질의 분포양상도 제1형 교원질과 마찬가지로 상아질모세포층의 기질에서는 분포되어 있지 않고 상아질내에서는 넓게 분포되어

있었다 (Fig. 9).

한편 FN은 상아질모세포층에서는 염색성을 보이지 않았지만, 세포와 세포사이의 부착부위와 전상아질과의 연결부위에서는 강한 분포를 나타내었다 (Fig. 10).

BSP는 거의 반응을 보이지 않았으나, 상아질모세포층의 전상아질층에서는 세포에서부터 상아질쪽으로 분포되어 있었다 (Fig. 11).

ON도 상아질모세포층의 세포부착부와 치유두에서는 거의 염색반응을 보이지 않았으나, 전상아질에서 강한 분포가 관찰되었다 (Fig. 12).

3. 상아질 형성

완전히 분화된 상아질모세포로부터 분비된 상아기질로 구성된 전상아질과 이 기질들이 광화되어 상아질이 형성되었다 (Fig. 13).

제1형 교원질은 전상아질과 상아질에서도 분포되었으나, 상아질에서는 전상아질과 비교하여 약하게 분포되었다 (Fig. 14).

제3형 교원질은 제1형에 비해 전상아질에서 강하고 넓은 분포를 보인 반면 광화가 완료된 상아질의 경우 거의 분포되어 있지 않았다 (Fig. 15).

FN의 경우 전상아질에서는 약한 반응을 나타내었지만 광화된 상아질에서는 거의 분포를 보이지 않았다 (Fig. 16).

BSP는 상아질과 전상아질에서 모두 분포되어 있었고, 염색정도가 부위마다 다르게 나타났다.

상아질에서보다 전상아질에서, 관상상아질보다는 석회화가 높은 관주상아질에서 더 강하게 분포되어 있었다 (Fig. 17).

ON에서는 제3형 교원질에서와 같이 전상아질에서 강한 반응을 보였으나, 상아질모세포의 부착부위에서는 약한 반응을 보이고, 석회화 상아질쪽에서 강한 반응을 보였다가 석회화 상아질내에서는 거의 반응을 보이지 않았다 (Fig. 18).

4. 치수형성

치수주변으로부터 중앙으로 상아질을 형성하는 상아질모세포층에 이어 섬유모세포가 밀집되어 치수중앙부에서는 치수세포의 수가 줄어들었

다 (Fig. 19).

제1형 교원질은 치수세포체에서는 반응이 없었으나 세포외기질에서는 섬유형태대로 분포되어 관찰되었다 (Fig. 20).

제3형 교원질도 제1형 교원질보다 더 강하게 치수기질에 많이 분포되어 있었으며 (Fig. 21), FN도 역시 치수기질에 많이 분포되어 있었고, 특히 혈관주위 벽에 강하게 분포되어 있었다 (Fig. 22).

한편 BSP는 치수세포체 뿐 아니라 세포외기질 속에서도 반응은 없었으며 (Fig. 23), ON은 치수세포의 기질 속에서 BSP에 비해 약간의 분포는 있었다 (Fig. 24).

5. 치유과정

FN은 혈병, 섬유소 및 육아조직 특히 염증세포 등에서 강하게 분포되어 관찰되었다 (Fig. 25).

FN은 새로 형성된 치수조직의 기질과 상아질모세포의 세포체의 부착부위에서 강하게 분포되었다 (Fig. 26).

제1형 교원질은 새로 형성된 치수조직에 전체적으로 분포되었으며 (Fig. 27), 특히 치수세포 사이의 기질에서 강하게 분포되었다 (Fig. 28).

제3형 교원질의 분포는 매우 약했다 (Fig. 29). ON은 치수의 결합조직에서는 특별한 반응은 없었지만, 석회화가 시작되는 전상아질 부위에서 강하게 분포되었다 (Fig. 30).

IV. 총괄 및 고안

일차 상아질모세포는 치아 형성시 나타나는 일차상아질이라 불리는 독특한 석회화기질을 합성, 분비하는 고도로 분화된 세포이다. 치유두외배엽성 간엽의 선택된 부위로부터 상아질모세포의 분화는 여러 가지 성장인자와 세포외기질 성분을 가지고 있는 상피-간엽 상호작용에 의해 이루어진다²⁵⁾. 세포증식 과정을 거치는 분화된 상아질모세포는 기질형성 세포의 특징으로 발육되고 극성을 완성시키는데 이 시기에 가장 먼저 분자변화를 일으키는 것은 제1형 교원질과 제3

형 교원질의 합성, 분비로 제1형 교원질은 장차 유기 상아기질의 주성분을 형성하는 기능적인 상아질모세포의 분화를 조절하는 단백질이다.

이 실험에서는 제1형 교원질은 상아질모세포의 분화와 관계없이 전체적으로 균등하게 염색되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 세포분화가 일어난 부위에 축적되었다가 세포분화가 완성되면 사라지는 현상은 관찰할 수 없었는데, 이것으로 보아 제1형 교원질은 세포의 분화에는 관여하지 않으며 단지 상아질을 구성하는 유기질의 주성분으로서 상아질모세포에 의해 분비되는 것으로 볼 수 있다.

상아질에서는 석회화된 상아질보다 전상아질에서 제1형 교원질에 대해 더 강한 반응을 보였는데 이것은 선험들^{26,27)}의 연구 결과와 일치하며, Carmichael 등²⁸⁾은 상아질과 전상아질에 존재하는 교원질 사이에 생화학적 차이점은 없다고 하였다. 따라서 이러한 결과는 치조골과 마찬가지로 무기질 결정에 의해 항원 결정인자가 가려졌거나(masking) 고정액 침투정도의 차이 때문이라고 생각된다.

제3형 교원질은 특징적으로 Hertwig 상피근초에 인접한 치낭과 치유두의 세포외기질에서 강한 염색성을 보이는 반면, 상아질모세포의 분화가 완료된 부분에서는 오히려 염색성이 줄어들었다. Hendrix 등²⁹⁾은 흰쥐 구치치배를 이용하여, 교두부에서는 제3형 교원질이 나타나지 않지만 교두간 부위에서는 나타나는 것을 관찰함으로써 교두형성과 제3형 교원질간의 관계를 제안하였다. 제3형 교원질은 배자나 태아와 같은 미분화조직에서 그 농도가 높게 나타나 형태분화에서 중요한 역할을 한다고 생각할 수 있다^{30,31)}. 또한 피부나 각막의 형태분화 과정에서도 이와 유사하게 제3형 교원질이 감소되는 양상으로 나타났다³²⁾. 제3형 교원질은 상아질모세포의 분화에 있어서도 이와 유사한 중요한 역할을 하며³³⁾, 흰쥐 구치 치관부의 상피-간엽 경계부에 존재하던 제3형 교원질은 상아질모세포가 분화된 후에는 사라지는 것을 관찰할 수 있다.

그러나 이 실험에서는 제3형 교원질도 전상아질에서 반응을 나타내었는데, Munksgaard 등³⁴⁾과 Lechner와 Kalnitsky³⁵⁾는 상아질모세포가 제

1형 교원질만을 생산한다고 보고한데 반해 Cournil과 Pomponio³⁶⁾는 면역형광법에 의한 연구에서 상아질에 제3형 교원질이 존재한다고 하였다. 이러한 상반된 원인에 대해 상아질모세포나 치수와 관련된 연구가 계속되어야 한다고 생각한다. 최근에 Lin 등³⁷⁾은 상아법랑경계에서의 교원질의 존재, 유형, 분포를 위한 연구에서 상아질과 법랑질의 경계에 두 조직에 걸쳐 동시에 삽입되고 있는 지름 80-120nm의 섬유성분이 존재하는 것을 관찰하였고, 여기에 immunogold 표지법을 이용하여 주사전자현미경으로 관찰한 결과 그것이 제1형 교원질임을 확인한 바 있다.

이 실험에서 전상아질 부위에 비해 상아질 부위에서 제1형 및 제3형 교원질의 염색성이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었는데, 이것은 마우스²⁷⁾나 흰쥐³⁸⁾에서의 선학들의 연구결과와 일치한다.

전상아질의 당단백은 광화과정 중 부분적으로 대사되어 상아질과 전상아질간의 당단백의 함량에는 차이가 있고³⁹⁾, 상아질과 전상아질 사이에는 교원질 함량에 거의 차이가 없으며²⁸⁾, 이 교원질 성분에 생화학적 차이도 없다⁴⁰⁾. 따라서 교원질에 대한 염색도가 전상아질에 비하여 상아질에서 감소되는 것은 상아질의 광화에 의한 교원질의 항원부위가 가려져서 나타나는 현상이라고 볼 수 있다.

이 실험에서 치수기질에서는 제1형과 제3형 교원질 모두에서 전체적으로 중등도의 면역반응이 나타났으며 상아질모세포층 직하방의 치수는 제3형 교원질에 대하여 강한 염색성을 보였으나 제1형 교원질에 대하여는 그렇지 않았다. 이것은 치수의 무세포대(cell-free zone)에 잘 발달된 모세혈관망과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각한다. Wang 등⁴¹⁾은 치수내의 혈관벽 주위가 제3형 교원질에 대해 강한 면역반응을 보인다고 보고하였다.

치근상아질을 형성하는 상아질모세포는 내치상피와 외치상피들이 증식하는 Hertwig의 상피근초로 알려진 두 층의 세포와 연관이 있는데, 이 실험에서는 이 세포를 싸고 있는 내측기저막에서 FN의 강한 분포가 관찰되었다. 이러한 관찰로 FN은 Hertwig 상피근초의 내측기저막의 구성성분 중의 하나이며 마찬가지로 치근 상아

질을 형성할 상아질모세포를 치유두세포로부터 기시시키는데 어떤 역할을 하고 있는 것으로 생각한다. FN은 결합조직 기질의 주성분이며, 기저막에도 분포하는⁴²⁾ 분자량이 큰 당단백질로, 주로 세포와 세포사이 혹은 세포와 세포의 구성분 사이의 부착을 증대하는 기능을 가진 것으로 알려져 있다⁴³⁾. 상아질모세포의 분화와 FN 사이의 관계를 살펴본 Thesleff 등²⁷⁾에 의하면 간엽세포로부터 상아질모세포가 분화될 때 FN은 감소된다고 하였으며, 또한 간엽세포가 상아질모세포로 분화되기 전에는 치아기의 기저막과 더불어 그 주위 간엽세포층에도 FN이 존재하지만 상아질모세포로 완전히 분화되면 기저막에만 국한되어 FN이 분포된다고 하였다. 이렇게 FN의 분포가 변화하는 것은 상아질모세포에서만 아니라 신장의 세관이 분화될 때도 동일하게 나타난다⁴⁴⁾. FN은 기저막의 주성분으로서⁴⁵⁾, 세포를 제자리에 위치시키고 세포가 그 위치에 부착되어 있도록 해주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

그러므로 이들 단백질이 상아질모세포의 견인과 안정성에 중요 요소인 것으로 보인다⁴⁶⁾. 이렇게 FN은 기저막과 분화중인 간엽세포 사이에서 서로가 긴밀한 접촉을 유지하도록 하는 역할을 하는 것으로 보이는데, 이러한 긴밀한 접촉은 상아질모세포의 분화를 유도하는 유도인자의 전달에 필수적인 요소로, 이러한 역할은 다른 부위에서의 FN의 분포로 확인할 수 있으며, FN은 흰쥐나 사람 피부에 있어서 안정되고 이미 분화가 끝난 부위에서는 발견되지 않는다⁴⁷⁾.

완전히 분화되어 치수주위상아질을 형성중인 상아질모세포의 경우, 세포체는 FN에 대하여 거의 염색되지 않았으나 세포의 근심단쪽 세포인 접면 세포막에서 FN 분포를 관찰할 수 있었다.

따라서 FN은 상아질모세포의 분화 뿐 아니라 상아질모세포간의 부착에도 관여하는 것으로 생각된다. 이러한 세포간 부착은 전상아질 부위를 외부환경으로부터 봉쇄시키는 역할을 함으로써, 이온에 대하여 서로 다른 투과성을 보이는 선택성 투과막으로 작용하여 광화과정 중에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보인다⁴⁸⁾. 또한 이 실험에서 전상아질의 FN이 중등도의 염색성을 나타내었는데 광화된 상아질은 FN에 대해 거의 반응

을 나타내지 않았다. 이러한 현상은 이전의 연구 보고와 일치하며^{27,38,48)}, 골, 연골 및 건 등에서도 관찰된다.^{30,49)} 이러한 현상은 FN의 항원성을 나타내는 부위가 무기질에 의해 가려졌기(masking) 때문이라고도 볼 수 있다. 그러나 Slavkin⁵⁰⁾ 등은 FN이 광화를 방해한다고 주장하고 탈회표본에서도 이러한 현상이 보인다는 것은 설명하기 힘들다. 따라서 상아질이 완전히 광화되기 위해서는 FN이 제거되어야 한다. 전상아질에 존재하는 당단백은 광화될 때, 일부는 광화되고 광화가 진행되는 과정에서 조직으로부터 점차 제거된다고 한다.⁵⁰⁾ 이러한 이유에서 이 부위의 FN이 대사되었을 수도 있다.⁵¹⁾

이 실험에서 형성중인 상아질에서의 BSP의 분포는 상아질모세포의 면역염색과 함께 상아질 형성시에 BSP가 분비되어 나타났다. 치유두의 미분화 외배엽성 간엽세포들로부터 상아질모세포들이 분화된 후, 상아질생성의 다음 단계는 상아질의 유기물질을 형성하는 것이다. 상아질모세포들은 교원질을 분비하면서 계속해서 크기가 증가되어 인접한 세포들끼리 서로 접촉하여 명확한 상아질모세포대가 형성된다. 유기기질인 상아질전이 형성되면 상아질모세포는 치수측으로 이동하여 상아질모세포돌기를 형성하는데 이 시기에 인회석의 미결정이 나타난다. 이들은 처음에는 기질소포내에 단일 결정으로 나타나서 급속히 성장하여 소포의 막을 뚫고 나가 미결정 덩어리로 분포되는데, 이는 인접한 덩어리와 융합하여 완전히 석회화된 기질을 형성할 때까지 계속 진행된다. 인회석 미결정체들이 침착되면 기질의 교원섬유는 미결정에 가려 잘 보이지 않게 된다. 이러한 방식으로 상아질이 형성되지만 아직 정확한 기전에 대해서는 논란이 되고 있다.

Romberg 등⁵²⁾은, BSP는 수산화인회석에 높은 친화성을 가지고 결정의 형성과 성장을 유도한다고 보고하였는데, 이 실험에서는 상아질보다 전상아질에서 더 강한 BSP 염색을 보였고 관상상아질에서보다 석회화 밀도가 높은 관주상아질에서 더 높은 BSP 반응을 보여 이를 뒷받침해 주고 있다. Fisher 등⁵³⁾은 BSP의 항체에 의해 상아질의 기질과 상아질모세포에 선택적으로 염색된다고 하였으며 Chen 등⁵⁴⁾은 porcine 상아질

의 상아질모세포에 BSP mRNA의 선택적인 분포를 보고하였다. 이 단백질은 이 실험에서 상아질모세포의 전상아질측의 세포체에서 상아질모세포돌기를 따라 분비된 양상이 관찰되어 골모세포와 마찬가지로 상아질모세포에서도 BSP가 분비된 후 석회화 초기단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.

Chen 등⁵⁵⁾은 흰쥐 상아질모세포에서 BSP mRNA의 분포를 보고하였는데, 이 연구에서도 상아질모세포의 면역염색이 상아질이 형성되는 동안 관찰되었고, 이 두 단백질은 상아질모세포돌기의 전 길이를 따라서 분비되어 나타났다.

더욱이 분비된 후 이들 단백질은 조금씩 양상은 다르지만 과석회화 영역인 관주상아질에 뚜렷이 염색되어 관찰되었다. 특히 이미 형성된 상아질보다 새로이 형성되는 전상아질에서 더 강하게 염색되어 관찰되었다. 그러나 이 연구와는 대조적으로 Mark 등⁵⁶⁾은 전상아질에서 이들 당단백질의 분포를 관찰할 수 없었다고 하여 상반된 결과를 보였는데, 이러한 차이는 개체 사이의 차이나 혹은 사용한 항체 사이의 다른 점으로 인한 분포의 차이로 여겨진다.

이 실험에서 ON은 제3형 교원질에서와 같이 전상아질에서 강하게 반응을 보였으며, BSP와는 달리 치수세포 기질측에서도 약간의 분포가 관찰되었다. ON은 석회화 초기단계⁵⁷⁾ 결정이 부착될 때 관여되고 성장에 영향력을 가지므로 일반적으로 석회화된 결합조직의 유기기질과 세포에 선택적으로 염색된다고 보고되었다⁵³⁾. 또한 ON이 연조직인 치수의 기질 속에서도 면역반응을 보이는 것은 이들 당단백이 교원기질과 결합할 수 있기 때문에 이들 일부가 형성되는 상아질에서 유리될 가능성이 있고, 이것이 치수기질 속으로 침투되어 나타난 것으로 생각된다. 따라서 ON은 상아질 발생 과정에서 상아질모세포에 의해 생산, 분비되어 새로운 상아질의 유기기질 형성에 관여하고 초기 석회화 과정에서 매개체로서 역할을 하는 것으로 생각된다.

치수강 노출후 치유과정에서 세포분화와 이동에 대한 연구에서 원래의 상아질모세포층의 손상이 관찰되었다. 손상된 상아질모세포를 대체하는 세포의 기원에는 2개의 가설이 있다. 첫째

는 치수의 가장자리에 위치한 세포치밀층에서 상아질모세포층의 전구세포가 분화되어 이동된다^{58,59)}는 것과, 또 다른 이론은 치수의 중심에서 손상부위로 이동되어 대체된다는 것이다. 이 상아질모세포의 전구세포는 치수 섬유모세포, 혈관주위세포, 또는 잔존된 미분화간엽세포 들이다^{60,61)}.

이 실험에서 치수강 노출 후 치유과정에서의 교원질 및 당단백의 분포를 보면 FN은 섬유소와 새로 형성된 교원섬유와 관련된 물질부분에서 분포되었다. 섬유소와 관련된 FN의 연구는 이 물질이 섬유소에 부착된다는 vitro 연구들과 일치되었다^{62,63)}. 이 FN의 기원은 혈장이며 급성염증 혹은 급성염증 후 외상시 발생하는 혈장의 FN 농도의 상승에서 기인한 것이다^{64,65)}. 섬유소 분자가 FN에 의해 쌓여 세포 이동층을 형성하여 섬유모세포가 섬유소에 부착하게 되는데 FN의 증가는 치수세포의 이동을 향상시키게 된다⁶⁶⁾.

치유과정의 초기에 새로운 교원질의 합성에서 FN의 기원은 알수없고, FN이 새로 형성된 기질의 일부분이라는 것은 확인할 수 있다. 배양된 섬유모세포에서 교원질과 함께 FN이 생성과 분비되고 있고 FN은 새로 형성되는 조직에서 교원질에 강하게 부착된다⁶⁷⁾. 섬유모세포는 교원질의 생성과 함께 파괴하는 능력도 가진다⁶⁸⁾. 따라서 FN의 교원질에 부착하는 것은 치유과정에서 육아조직의 개조시 교원질 제거에 매우 중요하다⁶⁹⁾.

한편 제1형 교원질은 상아질모세포의 분화과정에서 현저히 증가되었고 반대로 제3형 교원질은 상아질형성 과정중 상아질모세포에서 감소되고 치수간엽세포에서는 현저히 증가되어 나타났다.

최근 Lukinmaa⁷⁰⁾은 상아질모세포에서는 제3형 교원질이 합성, 분비된다고하였고, 반면에 Andujar⁷¹⁾은 상아질모세포는 제3형 교원질을 분비하지 않는다는 상반된 보고를 한 바 이러한 선행학들의 연구 결과로 제1형 교원질은 분화된 상아질모세포의 주산물인 반면, 제3형 교원질은 치수와 치낭의 간엽세포에 의해 더 많이 분비됨을 알 수 있다.

수복상아질의 기질에서 제1형 교원질이 밀집되어 분포되었으나 제3형 교원질은 나타나지 않

았다. 발육과정은 치유과정에서도 반복되며, 발육중인 상아질에서도 제3형 교원질은 나타나지 않았다. Lukinmaa⁷⁰⁾의 치아우식증의 연구에서 새로 형성된 상아기질에서는 제3형 교원질이 거의 나타나지 않았다고 보고하였는데 제3형 교원질은 치유과정의 초기단계에서 급히 합성되고 곧 사라진다는 연구보고로도 알 수 있다⁷²⁾.

ON은 치수의 결합조직에서는 거의 반응을 보이지 않았지만 석회화가 시작되는 전상아질 부위에서는 강하게 분포되었다. Sage¹¹⁾은 손상을 받아 치유되는 과정에서 ON이 강하게 분비된다고 보고하였는데, 이 실험에서도 발육과정에서와 마찬가지로 이 당단백이 분포되어있었다.

이상의 결과로 이들 교원질 및 당단백은 일차상아질과 치수의 형성뿐만 아니라 치수강 노출 후 치유과정에서도 그 구성세포에 의해 합성 및 분비될 수 있으며, 다른 단백질과 상호관련되어 발육 및 치유과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되지만, 정확한 합성과 분비기전 및 그 기능에 대해서는 의문점이 많다. 따라서 앞으로 분자생물학적 방법을 통해 이들 단백질의 분석 및 치료와 연관된 임상적 응용에 대해 더 깊은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

발육중인 치배와 치수강을 노출시킨 후 치유과정에서의 제1형, 제3형 교원질과 fibronectin (FN), bone sialoprotein(BSP) 및 osteonectin (ON)의 분포를 관찰하기 위하여 체중 110gm 내외의 Sprague Dawley계 흰쥐의 상악대구치와 주위조직을 실험재료로 하여 avidin-biotin conjugate(ABC)법을 이용한 면역조직화학적 방법으로 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. fibronectin은 새로 형성되는 상피근초의 내막을 따라 밀집되어 분포되었으며, 특히 신생혈관 주변에도 강하게 분포되었다. 또한 fibronectin은 치수세포, 상아질모세포 주변에도 강하게 염색되어 세포의 분화와 부착에 관여한다.
2. 제1형 및 제3형 교원질은 새로 형성되는 치수

결합조직, 상아전질에 강하게 분포되었고, 특히 치유과정의 결합조직에서 더욱 강하게 분포되어 치수결합조직과 상아기질 형성에 관여한다.

3. bone sialoprotein과 osteonectin은 치수조직에서는 거의 분포되지 않는 반면 상아질에서 강하게 분포되어 상아질의 유기기질 형성과 특히 무기질 침착에 관여한다.
4. 이러한 결과로 볼때 치수와 상아질 형성 및 치유시 이들 단백질이 세포의 분화와 부착 및 기질 형성에 관여하는 요소로 작용하였다.

REFERENCES

1. Reddi A.H. : Extracellular Matrix Biochemistry (Edited by Piez K.A. and Reddi A.H.). pp375-412, Elsevier, New York, 1984.
2. Thesleff, I., Lehtonen, E., and Saxen, L. : Basement membrane formation in transfilter tooth culture and its relation to odontoblast differentiation. *Differentiation*, 10 : 71-79, 1978.
3. Ruch, J.V., Fabre, M., Karcher-Djuricic, V., and Staubli, A. : The effects of L-azetidine-2-carboxylic acid (analogue of proline) on dental cytodifferentiations in vitro. *Differentiation*, 2 : 211-220, 1974.
4. 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.
5. 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.
6. 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. Wolgens, J.H.M., Bronckers, A.L.J.J., Lyaruu, D.M., editors. *Connect. Tissue Res.*, 32(1), 1995.
7. D'Souza, R.N., Bronckers, A.L.J.J., Happonen, R.P., Doga, D.A., Farach-Carson, M.C., and Butler, W.T. : Developmental expression of a 53 kD dentin sialoprotein in rat tooth germs. *J. Histochem. Cytochem.*, 40 : 359-366, 1992.
8. Ritchie, H.H., Hou, H., Veis, A., and Butler, W.T. : Cloning and sequence determination of rat dentin sialoprotein, a novel dentin protein. *J. Biol. Chem.*, 269 : 3698-3702, 1994.
9. Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L., and Martin, G.R. : Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 26 : 99-105, 1981.
10. Romberg, R.W. and Riggs, B.L. : Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium binding proteins. *Biochemistry*, 25 : 1176-1180, 1986.
11. Sage, H., Vernon, R.B., Decker, J., Funk, S., and Iruela-arispe, M.L. : Distribution of the calcium binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *J. Histochem. Cytochem.* 37 : 819-829, 1989.
12. Holland, P.W.H., Harper, S.J., McVey, J.H., and Hogan, B.L.M. : In vitro expression of mRNA for the Ca²⁺-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *J. Cell Biol.*, 105 : 473-482, 1987.
13. Hynes, R. : Molecular biology of fibronectin. *Ann. Rev. Biol.*, 1 : 67-90, 1985.
14. Lesot, H., Karcher-Djuricic, V., Mark, M., and Ruch, J.V. : Dental cell interaction with extracellular matrix constituents : type I collagen and fibronectin. *Differentiation*, 29 : 176-181, 1985.
15. Meyer, J.M., Lesot, H., Stäubli, A., and Ruch, J.V. : Immunoperoxidase localization of fibronectin during odontoblast differentiation. An ultrastructural study. *Biol. Struct. Morphol.*, 2 : 19-24, 1989.
16. Lesot, H., Kubler, M.D., Fausser, J.L., and Ruch, J.V. : A 165 kDa membrane antigen mediating fibronectin-vinculin interaction is involved in murine odontoblast differentiation. *Differentiation*, 44 : 25-35, 1990.
17. Yamamura, T. : Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J. Dent. Res.*, 64 : 530-540, 1985.
18. Smith, A.J., Tobias, R.B., Plant, G.C., Browne, R.M., Lesot, H., and Ruch, J.V. : In vitro morphogenetic activity of dentine matrix protein. *J. Biol. Buccale*, 18 : 123-129, 1990.
19. Tziafas, D. and Kolokuris, I. : Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells : an approach of secondary dentinogenesis. *J. Dent. Res.*, 69 : 75-81, 1990.
20. Tziafas, D., Kolokuris, I., Alvanou, A., and Kaidoglou, K. : Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by

- demineralized and native dentine or predentine. *Arch. Oral Biol.*, 37 : 119-128, 1992.
21. Tziafas, D., Amar, S., Stäubli, A., Meyer, J.M., and Ruch, J.V. : Effects of glycosaminoglycans on in vitro mouse dental cells. *Arch. Oral Biol.*, 33 : 735-740, 1988.
 22. Veron, M.H., Couble, M.L., Gaillot, G., Hartmann, D.J., and Magloire, H. : Expression of fibronectin and type I collagen by human dental pulp cells and gingiva fibroblasts grown on fibronectin substrate. *Arch. Oral Biol.*, 35 : 565-569, 1990.
 23. Seux, D., Couble, M.L., Hartmann, D.J., and Magloire, H. : Odontoblast-like cytodifferentiation of human pulp cells in vitro in the presence of calcium hydroxide-containing cement. *Arch. Oral Biol.*, 36 : 117-128, 1991.
 24. Veis, A. : The role of dental pulp-thoughts on the session on pulp repair processes. *J. Dent. Res.*, 64 : 552-554, 1985.
 25. 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.
 26. Takita, K., Ohsaki, Y., Nakata, M., and Kurisu, K. : Immunofluorescence localization of type I and type III collagen and fibronectin in mouse dental tissues in late development and during molar eruption. *Arch. Oral Biol.*, 32 : 273-279, 1987.
 27. 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.
 28. Carmichael, D.J., Chovelon, A., and Pearson, C.H. : The composition of the insoluble collagenous matrix of bovine predentine. *Calcif. Tissue Res.* 17 : 263-271, 1975.
 29. Hendrix, M.J., Hay, E.D., Mark, K. von der and Linsenmayer, T.F. : Immunohistochemical localization of collagen I and II in the developing chick cornea and tibia by electron microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 22 : 359-375, 1982.
 30. 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.
 31. Reith, E.J. : Collagen formation in developing molar teeth of rats. *J. Ultrastruct. Res.*, 21 : 383-414, 1968.
 32. Weinstock, M., and Leblond, C.P. : Radioautographic visualization of the deposition of a phosphoprotein at the mineralization front in the dentin of rat incisor. *J. Cell Biol.*, 56 : 838-845, 1973.
 33. Lesot, H. : Cell-matrix interactions during odontoblast differentiation. *Front. Matrix. Biol.*, 11 : 139-159, 1986.
 34. Munksgaard, E.C., Rhodes, M., Mayne, R., and Butler, W.T. : Collagen synthesis and secretion by rat incisor odontoblasts in organ culture. *Eur. J. Biochem.*, 82 : 609-617, 1978.
 35. Lechner, J.H. and Kalnitsky, G. : The presence of large amounts of type III collagen in bovine dental pulp and its significance with regard to the mechanism of dentinogenesis. *Arch. Oral Biol.*, 26 : 265-273, 1981.
 36. Cournil, I. and Pomponio, J. : Localization of procollagen I and III antigenicity in sections of rat incisor tooth, using the peroxidase-antiperoxidase technique. *Anat. Rec.*, 187 : 557-558, 1977.
 37. Lin, C.P., Douglas, W.H., and Erlandsen, S.L. : Scanning electron microscopy of type I collagen at the dentin-enamel junction of human teeth. *J. Histochem. Cytochem.*, 41 : 381-388, 1993.
 38. 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.
 39. Linde, A., and Persliden, B. : Cathepsin D activity in isolated odontoblasts. *Calcif. Tissue Res.*, 23 : 33-38, 1977.
 40. Cournil, C.P., Leblond, J., Pomponio, J., Hand, A.R., Sederlof, L., and Martin, G.R. : Immunohistochemical localization of procollagens. I. Light microscopic distribution of procollagen I, III and IV antigenicity in the rat incisor tooth by the indirect peroxidase-antiperoxidase method. *J. Histochem. Cytochem.*, 27 : 1059-1069, 1979.
 41. Wang, H.M., Nanda, V., Rao, L.G., Melcher, A.H., Heersche, J.N.M. & Sodek, J. : Specific immunohistochemical localization of type III collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-anti-peroxidase methods. *J. Histochem. Cytochem.*, 28 : 1215-1223, 1980.
 42. Stenman, S., and Vaheri, A. : Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissue. *J. Exp. Med.*, 147 : 1054-1064, 1978.

43. 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.
44. 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.
45. Vracko, R. : Basal lamina scaffold anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am. J. Pathol.*, 77 : 314-338, 1974.
46. 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.
47. Mosher, D.F., and Furcht, L.T. : Fibronectin : Review of its structure and possible functions. *J. Invest. Dermatol.*, 77 : 175-180, 1981.
48. Linde, A., Johansson, S., Jonsson, R., and Jontell, M. : Localization of fibronectin during dentinogenesis in rat incisor. *Arch. Oral Biol.*, 27 : 1069-1073, 1982.
49. Hassell, J.R., Pennypacker, J.P., Yamada, K.M., and Pratt, P.M. : Changes in cell surface proteins during normal and vitamin A-inhibited chondrogenesis in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 312 : 406-409, 1978.
50. 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.
51. 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, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev. Biol.*, 81 : 182-192, 1981.
52. Romberg, R.W., Werness, P.G., Lollar, P., Riggs, B.L., and Mann, K.G. : Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J. Biol. Chem.*, 260 : 2728-2736, 1985.
53. Fisher, L.W., McBride, O.W., Termine, J.D., and Young, M.F. : Human bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.*, 265 : 2347-2351, 1990.
54. Chen, J., McCulloch, C.A.G., and Sodek, J. : Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues : cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Arch. Oral Biol.*, 38 : 241-249, 1993.
55. Chen, J., Shapiro, H.S., and Sodek, J. : Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J. Bone Miner. Res.*, 8 : 987-997, 1992.
56. Mark, M.P., Butler, W.T., Prince, C.W., Finkelman, R.D., and Ruch, J.-V. : Developmental expression of 44 kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone γ -carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation*, 37 : 123-126, 1988.
57. Chovelon, A., Carmichael, D.J., and Pearson, C.H. : The composition of the organic matrix of bovine cementum. *Arch. Oral Biol.*, 20 : 537-541, 1975.
58. 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.
59. Veis, A., Tsay, T.-G., and Kanwar, Y. : An immunological study of the localization of dentin phosphophoryns in the tooth. *INSERM*, 125 : 223-232, 1984.
60. Yamamura, T., Shimono, M., Koike, H., Terao, M., Tanaka, Y., and 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.
61. Fitzgerald, M. : Autoradiographic temporal and spatial analysis of pulpal wound healing in the rat molar (abstract). *J. Dent. Res.*, 73 : 317, 1994.
62. Mosher, D.F. : Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *J. Biol. Chem.*, 250 : 6614-6621, 1975.
63. 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.
64. Bruhn, H.D., and Heimburger, N. : Factor VIII-related antigen and cold insoluble globulin in leukemias and carcinomas. *Haemostasis*, 5 : 189-192, 1976.
65. Matsuda, M., Yoshida, N., Aoki, N., and Wakabayashi, K. : Distribution cold-insoluble globulin in plasma and tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 312 : 74-92, 1978.
66. Ali, I.U., and Hynes, R.O. : Effects of LETS glycoprotein on cell motility. *Cell*, 14 : 439-446, 1978.

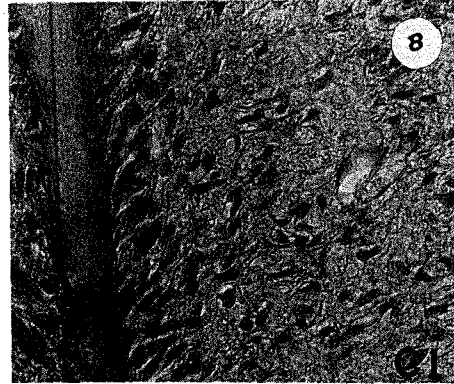
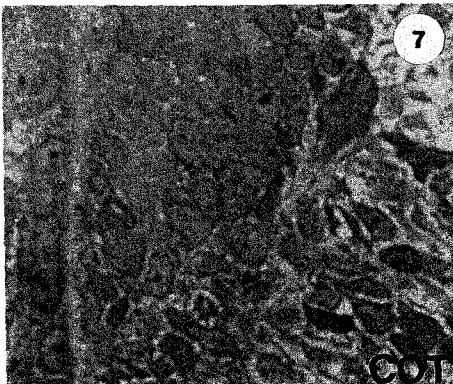
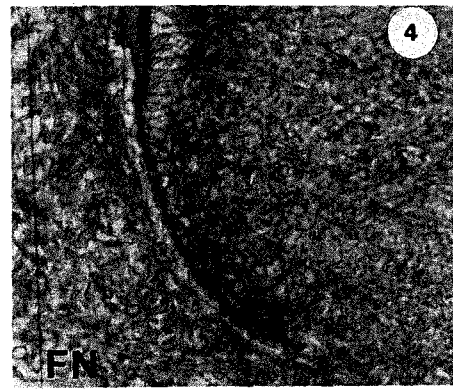
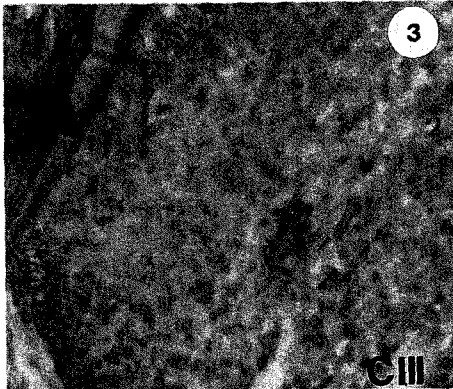
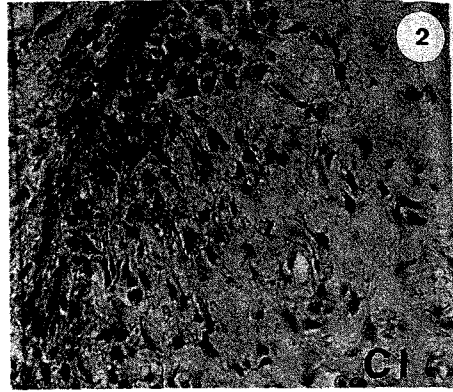
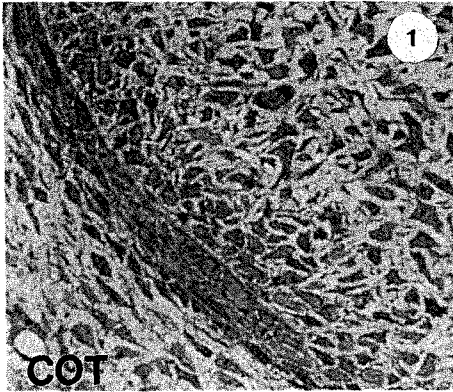
67. Jilek, F., and Hormann, H. : Cold insoluble globulin (Fibronectin). IV. Affinity to soluble collagen of various types. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359 : 247-250, 1978.
68. Grinnell, F. : The fibroblast receptor for cell-substratum adhesions : Studies on the interaction of baby hamster kidney cells with latex beads coated by cold insoluble globulin (plasma fibronectin). J. Cell Biol., 86 : 104-112, 1980.
69. Blumenstock, F.A., Saba, T.M., Weber, P., and Laffin, R. : Biochemical and immunological characterization of human opsonic α_2 SB glycoprotein : Its identity with cold-insoluble globulin. J. Biol. Chem., 253 : 4287-4291, 1978.
70. Lukinmaa, P.-L., Vahtokari, A., Vainio, S., Sandberg, M., Waltimo, J., and Thesleff, I. : Transient expression type III collagen by odontoblasts : developmental changes in the distribution of pro- α_1 (III) and pro- α_1 (I) collagen mRNAs in dental tissues. Matrix, 13 : 503-515, 1993.
71. Andujar, M.B., Couble, P., Couble, M.-L., and Magloire, H. : Differential expression of type I and type III collagen genes during tooth development. Development, 111 : 691-698, 1991.
72. Williams, I.F., McCullough, K.G., and Silver, I.A. : The distribution of type I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. Connect. Tissue Res., 12 : 211-227, 1984.

EXPLANATION OF FIGURES

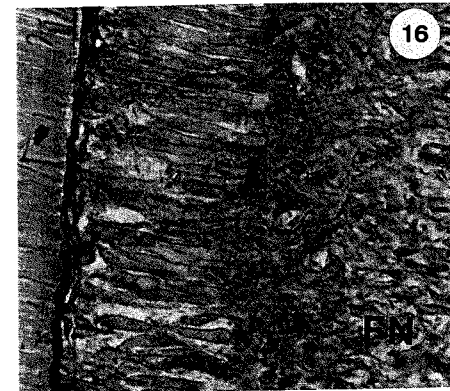
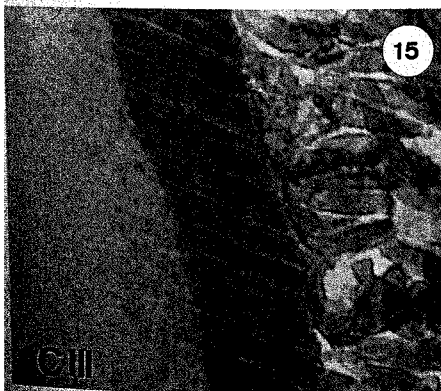
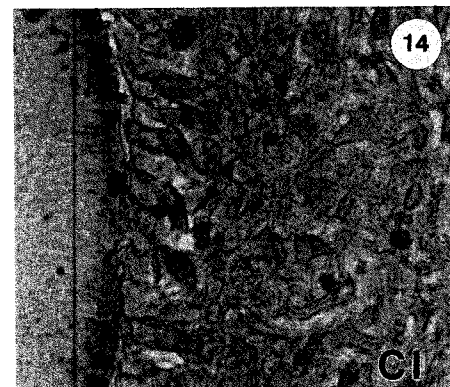
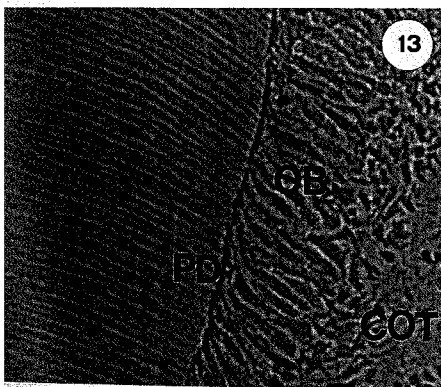
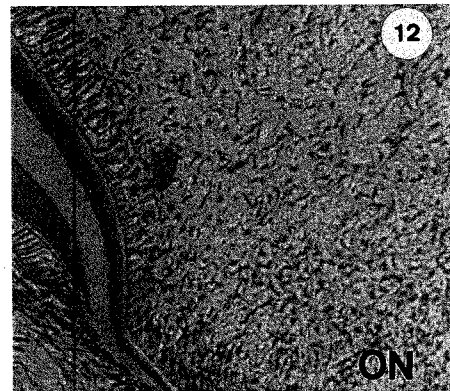
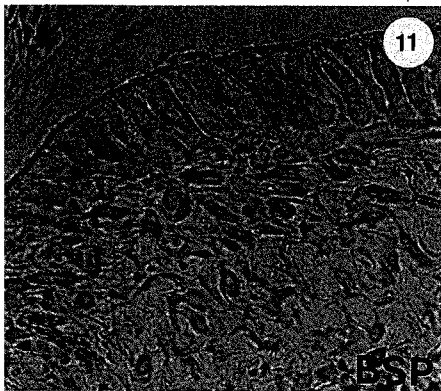
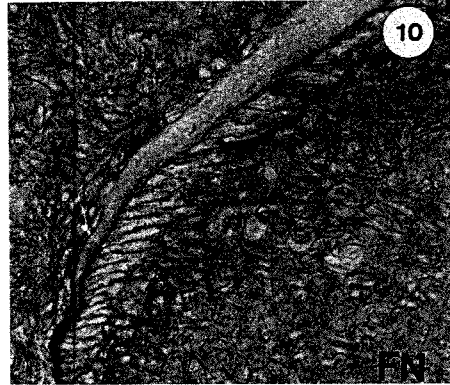
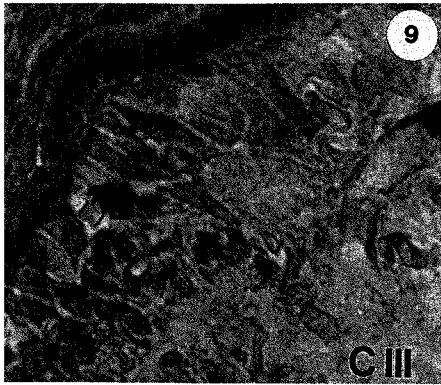
- Fig. 1. Epithelial root sheath has two layers of epithelium. Cells of dental papilla are not differentiated (negative control, X 200)
- Fig. 2. Stained with anti-type I collagen antibody. Extracellular matrix of the dental papilla shows intensive immunoactivity, whereas epithelial root sheath shows no immunostaining. (Anti-type I collagen, X 100)
- Fig. 3. Stained with anti-type III collagen antibody. The immunoreactivity of ECM adjacent to epithelial root sheath is strong. (Anti-type III collagen, X 100)
- Fig. 4. Stained with anti-fibronectin antibody. The inner basement membrane of the epithelial root sheath shows intensive immunoreactivity. (Anti-fibronectin, X 100)
- Fig. 5. Stained with anti-bone sialoprotein antibody. There is no immunoreactivity in the dental papilla and epithelial root sheath. (Anti-BSP, X 100)
- Fig. 6. Stained with anti-osteonectin antibody. Epithelial root sheath shows no immunostaining, whereas ECM of mesenchymal cells shows very weak staining. (Anti-ON, X 100)
- Fig. 7. Mesenchymal cells are migrated toward and attached to the epithelial root sheath and then differentiated into odontoblasts. (negative control, X 200)
- Fig. 8. Stained with anti-type I collagen antibody. Immunoreaction is seen throughout initial predentin, but cell body of the odontoblast shows no immunoreaction. (Anti-type I collagen, X 100)
- Fig. 9. Stained with anti-type III collagen antibody. The cell body of odontoblasts shows very weak staining, whereas predentin are intensive stained. (Anti-type III collagen, X 100)
- Fig. 10. Stained with anti-fibronectin antibody. Cell body of odontoblast shows little of immunoreactivity, whereas strong immunoreactivity is seen between the odontoblastic bodies. (Anti-fibronectin, X 100)
- Fig. 11. Stained with anti-bone sialoprotein antibody. The odontoblasts but not pulp cells are stained with the anti-BSP antibodies. (Anti-BSP, X 200)
- Fig. 12. Stained with anti-osteonectin antibody. Immunoreaction is prominent in the predentin, whereas odontoblasts and pulpal cells are showed weak or negative staining. (Anti-ON, X 100)
- Fig. 13. The odontoblasts are attached to the dentin and project a long cytoplasmic process into the dentinal tubules. (negative control, X 200)
- Fig. 14. Stained with anti-type I collagen antibody. Immunoreaction is intense in predentin. (Anti-type I collagen, X 200)
- Fig. 15. Stained with anti-type III collagen antibody. An intensely stained band is present at the predentin, whereas no staining on the mineral-containing dentin. (Anti-type III collagen, X 200)
- Fig. 16. Stained with anti-fibronectin antibody. No immunoreaction is seen in the mineral-containing dentin. (Anti-fibronectin, X 200)
- Fig. 17. Stained with anti-bone sialoprotein antibody. Dentin shows immunoreaction at a lower level than that observe in predentin, Antibodies react strongly with dentinal tubules(arrow). (Anti-BSP, X 200)
- Fig. 18. Stained with anti-osteonectin. The predentin shows a strong immunoreactivity (Anti-ON, X 200)
- Fig. 19. A negative control section incubated with PBS at pulpal tissue. (negative control, X 200)

- Fig. 20.** Stained with anti-type I collagen antibody. Positive immunoreaction is found in reticular pattern throughout the fibrous pulp tissue. (Anti-type I collagen, X 200)
- Fig. 21.** Stained with anti-type III collagen antibody. Bright immunoreaction is present on the pulpa tissue. (Anti-type III collagen, X 200)
- Fig. 22.** Stained with anti-fibronectin antibody. Broad immunoreaction is seen in pulp tissue, especially concentrated in the blood vessel walls. (Anti-fibronectin, X 200)
- Fig. 23.** Stained with anti-bone sialoprotein antibody. No immunoreaction is seen in loose connective tissue of the pulp. (Anti-BSP, X 200)
- Fig. 24.** Stained with anti-osteonectin antibody. Pulp matrix shows weak staining or negative staining (Anti-ON, X 200)
- Fig. 25.** Expression of fibronectin on 5 days after pulp perforation. Some immunoreaction is seen in the layer of odontoblasts forming reparative dentin and between the cell bodies. (Anti-fibronectin X 200)
- Fig. 26.** Expression of fibronectin on 5 days after pulp perforation. Immunoreaction intense in newly formed pulp tissue. (Anti- fibronectin, X 200)
- Fig. 27.** Expression of type I collagen on 5 days after pulp perforation. High levels of type I collagen in the population of cells that are nearest reparative dentin. (Anti-type I collagen, X 200)
- Fig. 28.** Expression of type I collagen on 5 days after pulp perforation. Broad immunoreaction is seen in pulp tissue, especially concentrated in the intercellular matrix of pulpal cells. (Anti-type I collagen, X 200)
- Fig. 29.** Expression of type III collagen on 5 days after pulp perforation. In the reparative dentin-pulp interface, matrix-producing cells do not express for type III collagen. (Anti-type III collagen X 200)
- Fig. 30.** Expression of osteonectin on 5 days after pulp perforation. Strong immunoreaction is seen throughout initial predentin, whereas no immunoreaction is seen throughout pulp tissue. (Anti-ON, X 200)

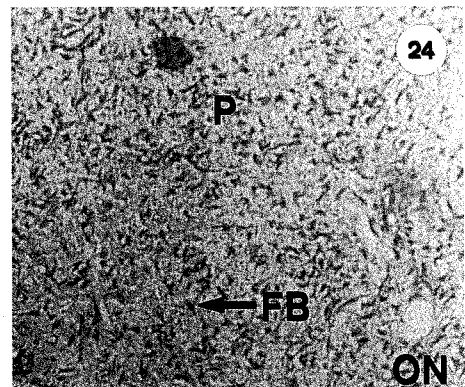
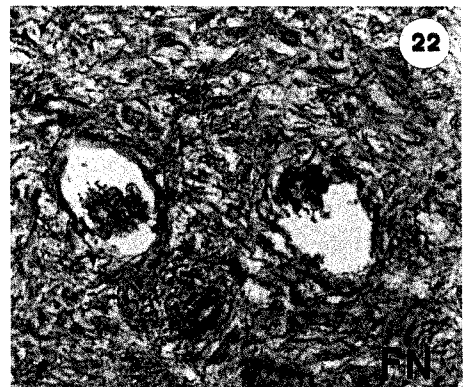
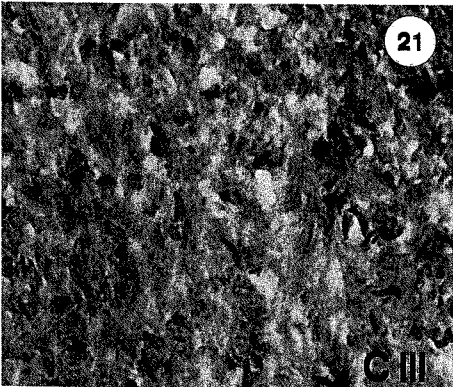
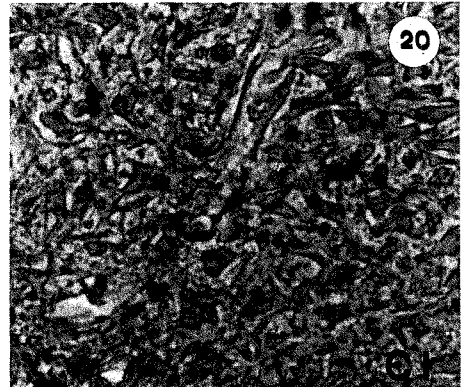
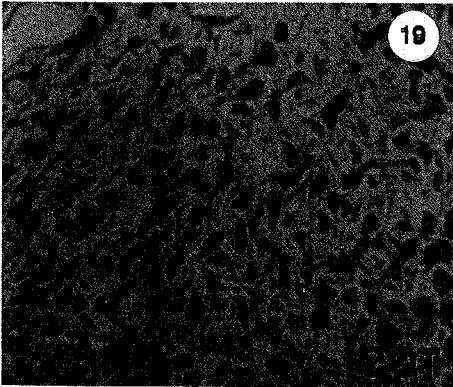
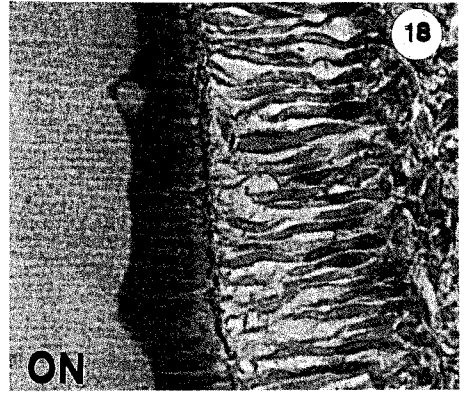
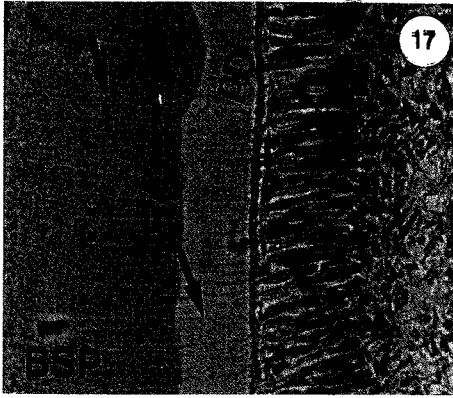
논문사진부도①



논문사진부도②



논문사진부도③



논문사진부도④

