생쥐 치아의 초기발생과정에서 Osteopontin mRNA의 발현

한경윤[1] · 조세열[1] · 임기정[1] · 김흥중[2] · 박주철[3] · 김병옥[1]

조선대학교 치과대학 치주과학교실[1]
구강해부학교실[2], 구강조직학교실[3]

I. 서론

지난 수십년동안 석회화(mineralization)과정을 조절하는 기전과 석회화조직들을 형성하고 유지하며 재생시키는데 관여하는 인자들과 세포들을 규명하는데 많은 연구가 있었다.

결합조직의 석회화 초기단계를 유발하는데 특별한 역할을 수행하는 것으로 알려진 bone sialoprotein(BSP)에는 BSP I과 BSP II 두 종류가 있는데[1], BSP I은 osteopontin(OPN)으로 더 많이 알려져있고[2-4] 34 kDa 당단백인 BSP II는 BSP로 일컬어진다[5,6].

석회화조직의 기질내로 함입되는 주된 비교원성 골단백이며 osteocalcin 및 교원질과 함께 복합체를 형성하는 sulphated phosphoprotein인 OPN은 secreted phosphoprotein I(SPP-I)[7] 또는 2ar[2,8,9], 44kDa bone phosphoprotein[10] 등 다양하게 표현되고 있다.

OPN의 발현은 골모세포[11], 골세포[10], 골수강내 기질세포(stromal cell)와 골막세포[5,19], 비대 연골세포(hypertrophic chondrocyte)[13,14], 석회화조직내에서는 물론 신장과 신경감각조직[15], 활성화된 T 림파구[16], 대식세포[17] 등과 같은 비석회화조직에서도 관찰되는데, Senger등[9]은 우유내에서 OPN의 발현을 확인하였다. 그 외에도 Nomura등[9]은 다양한 상피조직에서의 OPN mRNA 발현을 보고하였으며, Ikeda등[14]은 파골세포내에서의 OPN mRNA 발현을 보고하였다.

석회화조직내에서 OPN의 역할은 골모세포와 골세포의 이주, 부착 및 분화를 조절하고 석회화를 유도하며, 결정체의 성장을 조절하는 데 관여한다[1,18-21]. MacNeil등[22]은 백악질형성과정에서 OPN과 BSP가 중요한 역할을 수행할 뿐만 아니라, OPN이 비석회화조직내에서도 발현되는 것으로 미루어 치주인대형성시 OPN이 치주인대의 석회화를 억제하는 보호적 기능을 수행하는 것과 밀접한 관계가 있다고 주장하였다. 한편 Reinholt등[23]은 OPN을 파골세포에 대한 부착분자로 간주하였는데, OPN mRNA는 골형성중에 골모세포에서 발현되고, 골흡수부위에서 파골세포와도 관련되어 발현되는 바 OPN은 골형성은 물론 파골세포의 기능에도 영향을 미쳐 골흡수 활성에도 관여하는 것으로 알려졌다[24].

성숙된 치주조직에서 치주인대는 백악질과 치조골에 매식되어 다양한 기능을 수행하는데, Cho등[25]은 세포배양실험을 통하여 치주인대

*이논문은 1997년도조선대학교학술연구비의 지원을받아연구되었음

세포들이 석회화 결절(mineralized nodule)을 형성할 수 있음을 확인하였고, Lekic등[26]은 치주인대를 포함하는 골결손부에서 치주인대의 유무 및 치유과정에 따른 OPN의 발현양상을 비교한 결과 치주인대가 있는 경우에서 OPN이 강하게 발현되고, 치조골과 치주인대의 경계부에서 치유경과에 따라 계속적으로 증가되는 OPN의 발현 특징을 보고하면서 치주인대 및 치조골의 재생과정에도 OPN이 중요한 역할을 수행할 수 있다고 제안하였다.

치주조직의 성공적인 재생을 얻는데는 치조골 재생은 물론 건강한 백악질을 얻는 것이 필수요건이라 할 수 있다. 치주조직의 재생을 도모하는데 재현성이 높은 임상술식을 개발하기 위해서는 치조골과 백악질간의 유사성과 차이점을 이해하고, 치아발생과정에서의 석회화조직을 조절하는 인자들과 세포들을 규명하는 것 또한 매우 중요하다 하겠다. 따라서 백악질과 관계 깊은 부착인자들을 규명하고 이들을 합성하는데 관여하는 세포들을 확정하므로써 재생형 치주치료과정에서 이들 인자들을 이용할 수 있으리라 예견되었다.

이와 같이 OPN은 치주조직의 형성뿐만 아니라 치유에도 지대한 영향을 미치는 요소중의 하나로 인식되는 바 선학들의 연구결과들을 토대로 *in - situ* hybridization을 통하여 발생중인 생쥐의 치아 및 주위조직에서의 OPN mRNA의 발현양상을 분석함으로써 향후 재생형 치주치료 술식의 개발을 위한 연구에 도움을 줄 수 있는 기초자료를 제시하고자 이 연구를 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. RNA 추출

OPN이 발현되는 것으로 알려진 태생 15일의 생쥐 연골조직에서 total RNA isolation kit(Promega, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 total RNA를 얻어 riboprobe 제작을 위한 RT - PCR(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)에 이용하였다.

2. 프로브(probe) 제작을 위한 RT - PCR과 클로닝(cloning)

생쥐의 연골조직에서 얻은 5㎍의 total RNA나 1㎍의 [poly(A)+] RNA를 DEPC - water에 용해한 후, Superscript Preamplification System(GIBCO BRL, USA)을 사용하여 2㎕의 total RNA에 4㎕의 reaction buffer, 1㎕의 RNase inhibitor, 2㎕의 deoxyribonucleotide mixture, 300 pmol의 oligo(dT) primer와 2㎕의 reverse transcriptase의 조합으로 42℃에서 60분동안 반응시켜 first - strand cDNA를 합성하였다.

PCR을 위한 oligonucleotide primer 제작을 위하여 Internet상에서 NIH의 Genebank database를 찾아 OPN 유전자의 nucleotide sequence를 확인한 후, Genetics program을 이용하여 primer를 설계하고 제작하였다.

PCR 반응은 94℃에서 1분, 53℃에서 1분, 72℃에서 2분씩 30 - 40주기 증폭하고 72℃에서 10분간 확장하였다. PCR 산물은 pGEM T - easy vector(Promega, USA)로 15℃에서 16시간 반응시킨 후 LB - amp 배지에서 배양하여 DNA를 정제하였다.

3. DNA 염기서열 분석

RT - PCR에 의하여 클로닝된 생쥐 cDNA 단편을 약 300 - 500bp 정도의 크기로 sticky end나 blunt end를 형성하는 제한효소로 처리한 후 다시 pBluescript SK(+) plasmid vector에 subcloning하였다. Plasmid mini kit(Quigen, USA)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하고 ABI 373S automatic sequencer를 이용하여 dideoxy chain termination

method로 염기서열을 분석하여 프로브로 이용할 cDNA의 sense와 antisense strand의 위치를 확인하였다.

4. 조직 절편의 *in - situ* hybridization

1) cRNA riboprobe의 준비

프로브의 형성과정은 DNA를 sense와 anti - sense 방향에 맞게 제한효소로 처리하여 선형화시킨 후 10% SDS와 20mg/ml proteinase K(RNA grade: RNAase free condition)용액에서 1시간 처리하고 회수하여 DNA농도를 spectrophotometor로 측정하였고, DIG RNA labelling kit(SP6/T3/T7, Behringer Manheim, Germany)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 Digoxigenine - labelled RNA probe를 합성하였다. 프로브는 sense와 anti - sense 프로브를 모두 합성하여 동일한 조건에서 hybridization하였다.

2) *In - situ* hybridization

생쥐 embryo 발생 11일부터 1일 간격으로 생후 18일 까지의 발달 단계별 생쥐 embryo를 4℃, 4% paraformaldehyde 용액에서 16시간 고정한 후 PBS용액으로 2시간 세척하고, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV 알콜로 각각 12시간씩 탈수하였다. Chlorform 용액에서 4회 2시간씩 처리한 후 paraffin 포매 하고 5㎛ 두께로 연속 절단(serial section)한 후, ethoxysilran - coated 슬라이드에 붙여 사용 전 까지 - 4℃에 보관하였다. 연속 절편을 절편 10장 당 1장의 비율로 Hematoxylin - Eosin stain 하여 치아 발생단계를 판정 한 후 적절한 단계의 절편을 실험에 이용하였다.

절편을 xylene으로 탈 파라핀 처리하고 100%, 90%, 80%, 70% ethanol의 순서로 함수시킨 후, 고정액(4% formaldehyde in 1X PBS)에 10분간 고정하였다. PBS로 두 차례 세척하고 acetylation 용액(0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine - HCl, pH 8.0)에 10분간 처리한 후 2X SSC(0.15M sodium chloride, 0.015M sodium citrate)로 두 차례 세척한 다음 탈수 및 탈지(70% ethanol: 1분, 80% ethanol: 1분, 95% ethanol: 2분, 100% ethanol: 1분, 100% ethanol: 5분, 95% ethanol: 1분)과정을 거쳐 공기 중에서 건조시켰다. 50% formamide, 10mM Tris - HCl, 200㎍/ml tRNA, 600mM NaCl, 0.25% SDS, 1mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 105 Dextran sulfate가 함유된 용액에 프로브를 넣고 50℃에서 16시간 hybridization하였다. Hybridization 후 2X SSC, 0.2X SSC I, 0.2X SSC II로 각각 세척한 다음 1.5% blocking reagent(Behringer Manheim, Germany)가 함유된 Dig buffer I(100mM Tris - HCl, 150mM NaCl)으로 다시 세척하고 anti - Dig antibody를 1:88로 Dig buffer I에 희석하여 4

```
        1   gcagggagcgaggattctgtggactcggatgaatctgacgaatctcaccattcggatgag
60
                ____________
       61   tctgatgagaccgtcactgctagtacacaagcagacactttcactccaatcgtccctaca
120
      121   gtcgatgtccccaacggccgaggtgatagcttggcttatggactgaggtcaaagtctagg
180
      181   agtttccaggtttctgatgaacagtatcctgatgccacagatgaggacctcacctctcac
240
```

Figure 1. Nucleotide sequence of the mouse osteopontin cDNA fragments obtained by RT - PCR. The oligonucleotide primer sites were underlined.

℃에서 30분간 처리하였다. 다시 Dig buffer II(100mM Tris - HCl, 100mM NaCl, 500mM $MgCl_2$)로 세척하고 NBT/BCIP로 발색시킨 후 Dig buffer IV(10mM Tris - HCl, 1mM EDTA)로 3분간 다시 세척하고 methyl green으로 대조 염색한 후 광학현미경 하에서 관찰하였다.

III. 연구결과

1. 클로닝된 생쥐 OPN cDNA의 염기서열 분석

RT - PCR을 통하여 얻은 생쥐 OPN cDNA 단편은 염기서열분석과 homology 검색 결과 1385bp의 생쥐 OPN mRNA의 361에서 689번째의 nucleotide에 100%의 homology를 갖는 약 300bp의 cDNA 단편으로 확인되었다(Figure 1).

2. OPN mRNA의 발현

1) 뇌상기(bud stage)

생쥐 태생 13일 표본에서 상피가 악골의 외배엽층으로 증식하는 전형적인 뇌상기 양상을 보였으며, 구강내의 일차상피띠(primary epithelial band)와 치배의 상피성싹(epithelial bud) 및 주위의 외배엽성 간엽세포에서도 OPN의 발현이 관찰되지 않았으나, 치배 주위에서 발생중인 연골과 치조골 부위에서는 OPN mRNA의 발현이 관찰되었다(Figure 2).

2) 모자상기(cap stage)

생쥐 태생 15일 표본에서 구강상피의 증식이 더욱 현저하여 모자형태를 이루는 양상을 보였으며, OPN mRNA는 치아기(dental organ), 치유두(dental papilla) 및 치낭(dental follicle)을 포함하는 발생중인 치아 및 인접주위조직에서 발현되지 않았고(Figure 3), 치배주위의 치조골이나 발생중인 척추(vertebrate) 부위의 연골들에서는 OPN의 발현을 뚜렷이 관찰할 수 있었다(Figure 4, 5).

3) 종상기(bell stage)

조직분화와 형태분화를 보이는 종상기 후반에서는 치유두의 간엽세포로부터 상아모세포(odontoblast)가 분화하여 치아의 교두정 부위부터 상아질을 형성하고 치아기에서 발생한 법랑모세포(ameloblast)들도 관찰되었다. 상아질을 형성하고 있는 상아모세포에서는 OPN mRNA의 강한 발현이 나타났으나 치경부의 분화중인 상아모세포에서는 OPN의 미약한 발현이 확인되었다. 그러나 법랑질을 분비중인 법랑모세포나 치유두 및 치낭의 세포들에서 OPN mRNA의 발현은 관찰되지 않았다(Figure 6, 7, 8).

4) 경조직 형성기(hard tissue formation stage)

생쥐 출생 16일 표본에서는 치관이 형성되고 치근형성이 진행중에 있는 양상이 나타났으며, 형성중인 치근을 따라서 분화 과정에 있는 치주인대 세포들에서 OPN mRNA의 발현이 관찰되었다(Figure 9).

IV. 총괄 및 고안

OPN은 highly phospholylated 44 kDa형과 less phospholyated 55 kDa형 두 종류로 구분되는데, OPN형태의 phosphorylation은 calcium phosphate에 대한 결합친화성을 증가시키고, sulphation은 세포분화와 함께 증가된다[27,28]. 44 kDa OPN은 골형성중 결정체 형성 및 성장을 조절하는데 관여하고, 55 kDa OPN은 기질의 석화화에 영향을 미치기 보다는 골형성조직(osteogenic tissue)의 초기 조직화에 관여되는 것으로 알려졌다[1]. Wrana등[29]은 TGF - β가 55 kDa OPN의 합성에 선택적으로

영향을 미치는 것을 확인하고 55 kDa OPN이 골의 회복(repair)과 재조형(remodelling)에 중요한 역할을 수행할 수 있음을 제안하였다.

치아의 발생과정은 4단계로 진행되는데, 악골의 외배엽층내로 상피가 증식(ingrowth)되는 뇌상기(bud stage)로부터 시작되어 상피세포들이 더욱 증식되어 모자형태를 이루는 모자상기(cap stage), 종모양을 보이며 조직분화와 형태분화기인 종상기(bell stage)를 거쳐 치관형성이 완료되고 치근형성이 나타나는 경조직형성기에 이르게 된다.

이 연구에서는 생쥐 태생 11일부터 생후 18일 까지 1일 간격으로 발달 단계별 생쥐 embryo 표본을 제작한 후 연속 절편을 절편 10장당 1장의 비율로 Hematoxylin - Eosin stain을 시행하여 치아 발생단계를 판정한 후 적절한 단계의 절편을 실험에 이용하였는데, 이는 태생 4일 - 14일경에 OPN mRNA의 발현이 절정을 이룬다고 한 Chen[30,31,]등의 보고를 참조하였다.

OPN에 관한 연구들은 대부분 면역조직화학적 방법[31,5,10]이나 *in - situ* hybridization방법[14,8,32,33]이 이용되고 있는데, 면역조직화학적 방법은 단백질과 유전자 산물을 추적하는데 비해 *in - situ* hybridization방법은 mRNA 또는 DNA 자체를 추적하는 차이가 있다. 즉 면역조직화학적 방법으로는 어떤 물질의 분포는 알 수 있으되 그 기원을 확인할 수 없다. 따라서 이 연구에서는 치아발생 초기에 OPN의 생성에 관여하는 특이세포를 규명하기 위해서 *in - situ* hybridization방법을 이용하였다.

치아발생의 초기단계로 일차상피띠(primary epithelial band)와 치배의 상피성싹(epithelial bud)이 나타나는 뇌상기(bud stage)와 치아기(dental organ), 치유두(dental papilla) 및 치낭(dental follicle)이 발생되는 모자상기(cap stage)에서 OPN mRNA의 발현을 관찰한 이 연구결과 치배 주위에서 발생중인 연골과 치조골 부위에서만 나타났을 뿐 치배에서는 관찰되지 않았다.

골형성과정에서 OPN의 역할에 관한 연구에서 다양한 결과들이 발표되었는데, Nagata등[34]은 석회화전의 골기질내에서 OPN의 발현이 관찰되지 않은 점으로 미루어 OPN이 hydroxyapatitie형성의 주된 핵은 아닌 것으로 간주한 반면 Kasugai등[27]은 44kDa OPN과 BSP가 hydroxyapatite 결정체에 급속히 부착함을 확인하고 골형성중에 결정체의 형성과 성장을 조절하는데 OPN이 관여하고 있다고 상반된 결과를 보고하였고, Ikeda등[14]은 골모세포, 골세포, 비대 연골세포에서 OPN mRNA의 발현을 관찰하였고, 특히 periosteal 부위보다는 endosteal 부위에서 더 강하게 발현되었다고 보고하였다.

치아발생단계중 중간단계에 속하는 종상기(bell stage)에는 치아기(dental organ), 치유두(dental papilla) 및 치낭(dental follicle)의 구조를 이루는데, 치유두의 간엽세포로부터 상아모세포(odontoblast)가 분화하여 치아의 교두정 부위부터 상아질을 형성하고 치아기에서 법랑모세포(ameloblast)들이 발생되어 법랑질을 형성하며, 향후 신생 치근면에 부착되는 치주인대세포들과 섬유속들을 포함하는 치아지지조직의 형성은 치낭과 관련된다.

MacNeil등[22,24,35,36]은 상아모세포에서의 발현이나 상아질형성에서의 OPN의 역할은 명확하지 않다고 하였고, BSP는 상아모세포와 백악모세포가 각각 상아질과 백악질로 분화하는데 중요한 역할을 담당한다고 하였으며, 태생 1 - 3일된 백서 상아질형성기 초기단계에서는 상아모세포에서 OPN이 발현되지 않고 말기에 늦게 발현됨이 면역조직화학적, *in - situ* hybridization, Northern blot을 통한 연구에서 일관성 있는 결과로 나타났다고 하였는데, 이 연구에서는 종상기에 OPN mRNA의 발현이 상아질을 형성하고 있는 상아모세포에서는 강하게 나타났으며, 치경부의 분화중인 상아모세포에서는 미약하였으나, 법랑질을 분비중인 법

랑모세포나 치유두 및 치낭의 세포들에서는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 OPN이 상아모세포가 상아질을 형성하는 과정에 관여하고 있음을 시사하고 있다.

구강내에는 네 가지 경조직 즉 법랑질, 상아질, 백악질 및 골조직이 존재하는데, 그중 백악질과 골조직은 유기질과 무기질의 구성성분과 구조적 관점에서 가장 밀접한 관계가 있다. 반면에 골조직에 대한 백악질의 차이점은 혈관과 신경분포가 없으며, 재조형(remodeling)이 일어나지 않고, 수행하는 기능이 다르다는 점으로 특징지어진다.

발생중인 치주인대에서 OPN의 발현에 관해서도 다양한 결과들이 보고되었는데, MacNeil등[35]은 41일째 생쥐 대구치에 대한 *in - situ* hybridization을 통하여 골모세포와 백악모세포에서는 OPN이 발현되었으나 치주인대에서는 발현되지 않았다고 보고하였다. D'Errico등[37]은 OPN의 발현이 치근표면을 따라 존재하는 세포들과 치조골 변연세포에서 관찰되었으나 치수 및 치주인대세포에서는 관찰되지 않았고 치근형성의 말기에 전 치주인대부위에서 OPN의 발현이 관찰되었다고 보고하였다.

치아발생단계중 말기에 속하는 경조직 형성기의 경우 형성중인 치근을 따라서 분화 과정에 있는 치주인대 세포들에서 OPN mRNA이 발현됨을 확인한 본 연구결과는 경조직 형성시기에 따라 OPN이 특징적인 발현양상을 보임을 면역조직화학적으로 확인한 Chen등[31]과 Yao등[38]의 보고를 고려할 때 치근완성도와 치주인대 형성시기에 따라 OPN의 발현양상이 다르게 나타날 수 있음을 시사하였으며, 치낭에서 섬유모세포가 치주인대로 분화하는데 OPN이 중요한 역할을 담당하고 있고, 치낭에서의 OPN 발현이 reticulum층과 intermedium층에서 관찰되었다고 보고한 MacNeil등[24]의 연구보고와 생쥐 치근형성의 초기단계에서 OPN이 백악질에서 발현된다고 한 Somerman등[39]의 연구결과를 지지하였다.

Lang등[40]은 백악질의 전구세포는 치조골내에 있다고 하였으며, Somerman등[41]은 백악질 형성에 다양한 부착단백들이관여한다고 하였고, Arzate등[18]은 백악질유래 부착단백과 OPN을 비교분석한 결과 골세포의 증식은 백악모세포로 분화할 수 있는 능력이 있다고 보고하였는데, Bronkers등[42]은 무세포성 백악질층에서 백악질과 치주인대에 인접하고 있는 많은 세포들에서 OPN이 발현됨을 확인하고 백악모세포는 odontoblast - like phenotype이 아니라 osteoblast - like phenotype을 나타낸다고 결론지었다.

성숙한 백악질에서는 BSP, OPN, vitronectin, 백악질 부착단백, fibronectin을 포함하는 Arg - Gly - Asp연관 부착단백들이 추출되는데 이러한 백악질 추출물들은 치은섬유아세포와 치주인대세포들의 이주[21], 부착[43,44], 증식 및 단백질 합성[45]을 촉진하는 역할을 수행한다.OPN과 BSP가 백악질의 주된 구성성분이며, 이들 단백질은 인접한 백악모세포들에 의해 분비됨이 immunogold labeling[46,20], 면역조직화학적[36] 및 *in - situ* hybridization[22]을 통하여 확인되었다. MacNeil[22]등은 생쥐 태생 27일째에 무세포성 백악질의 형성이 시작되는데 이때는 OPN이 상아모세포에서만 발현될 뿐 치근면에서는 발현되지 않았고, 치아가 맹출중일 때에는 치근표면, 치주인대부위 그리고 치아맹출경로에서 OPN이 발현됨을 확인하였으며, 특히 치근형성 말기단계에서 OPN의 치주인대내 발현은 석회화 억제물질로 작용함으로써 보호적 기능을 수행하는 것으로 설명하였다. 또한 McAllister등[43]은 백악질에는 섬유모세포의 부착을 매개할 수 있는 물질들을 함유하고 있다고 하였고, 이 물질들은 치은섬유모세포들과 치주인대 세포들의 치근면에 대한 부착을 촉진함으로써 치주결합조직 형성과 재생에 중요한 역할을 수행한다고 하였다.

이 연구 결과와 선학들의 연구보고들을 종합해 보면 치아의 초기발생과정에서 OPN이 치조

골, 상아질 및 치근의 형성에 중요한 역할을 담당하고 있다고 결론지을 수 있으며, 이는 파괴된 치주조직에 대한 재생형 치주치료후 치주조직의 재생과정에서도 OPN이 중요한 역할을 수행할 수 있음을 시사하였다. 본 연구에서는 치아발생 초기단계만을 포함하였고, OPN mRNA만을 분석하였으나, 향후 치근형성이 완료되고 치아 맹출과정 및 치유반응중에서의 OPN의 역할을 규명하고, 또한 BSP, osteocalcin 및 osteonectin 등의 역할 규명을 포함하는 보다 광범위하고 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결론

치아의 초기 발생과정중에 치아 및 주위조직에 OPN이 미치는 영향을 규명하기 위하여 생쥐 embryo 발생 11일부터 1일 간격으로 생후 18일까지 생쥐 embryo의 조직표본을 제작한 후 Hematoxylin - Eosin stain하여 적절한 치아발생단계의 절편을 선택한 다음 생쥐의 치아발생단계별 치아 및 주위조직에서의 OPN mRNA의 발현양상을 *in - situ* hybridization으로 분석함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌상기(bud stage)와 모자상기(cap stage)동안 OPN mRNA의 발현이 치배주위에서 발생중인 연골과 치조골 부위에서는 관찰되었으나, 치아기, 치유두 및 치낭에서는 관찰되지 않았다.
2. 늦은 종상기(bell stage)의 경우 OPN mRNA의 발현이 상아질을 형성하고 있는 상아모세포에서는 강하게 나타났으나, 법랑모세포에서는 나타나지 않았다.
3. 경조직 형성기에서는 형성중인 치근을 따라서 분화과정에 있는 치주인대 세포들에서 OPN mRNA이 발현되었다.

치아의 초기발생과정에서 OPN이 치조골, 상아질 및 치근의 형성에 관여하고 있음을 나타낸 이상의 연구결과는 치주조직의 재생과정에서 OPN의 역할을 규명하기 위한 추가적인 연구가 계속되어져야 함을 제기하고 있다.

VI. 참고문헌

1. Butler, W.T..“ The nature and sig - nificance of osteopontin. ” *Connect. tis - sue Res.* ***23***:123 - 136, 1989. 18. Arzate, H. Alvarez - P rez, M.A. Aguilar - Mendoza, M.E. Alvarez - Fregoso, O.. “ Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*. ” *J.Periodont. Res.* **33**:249 - 258, 1998.
2. Craig, A.M. Nemir, M. Mukherjee, B.B. Chambers, A.F.Denhardt, D.T.. “ Osteopontin, a transformation - associ - ated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12 - O - tetradecanoylphorbol 13 - acetate in mouse epidermis. ”*J. Biol. Chem.* ***264***:9682 - 9689,1989.
3. Helder, M.H. Bronkers, A.L.J.J. W ltgens, J.H.M..“ Dissimilar expression patterns for the extracellular matrix pro - teinsosteopontin(OPN) and collagen type I in dental tissues and alveolar bone of the neonatal rat. ”*Matrix* ***13***:415 - 425, 1993.
4. Oldberg, A. Franzen, A. Heinegard, D..“ Cloning and sequenceanalysis of rat bone sialoprotein(osteopontin) cDNA reveals an arg - gly - asp cell - binding sequence. ” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA****83***:8819 - 8823, 1986.
5. Chen, J. Zhang, Q. McColloch, C.A.G. Sodek, J.“ Immunohistoc - hemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues : Comparisons with

secreted phosphoprotein 1(SPP - 1, ostopontin) and SPARC(osteonectin). " *Histochem. J.* **23**:281 - 289, 1991.

6. Ecarot - Charrier, B. Bouchard, F. Delloye, C.. " Bone sialoprotein IIsythesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate. " *J. Biol. Chem.* **264**:20049 - 20053, 1989.
7. Fet, V. Dickinson, M.E. Hogan, B.L.M.. " Localization of the mouse gene for secreted phosphoprotein 1(SPP - 1)(2ar, osteopontin, bone sialoprotein 1, 44kDa bone phosphoprotein, tumour - secreted phosphoprotein) to chromo - some 5, closely linked to *Ric*(*Rickettsia* resistance). " *Genomics* **5**:375 - 377, 1989.
8. Nomura, S. Wills A.J. Edwards, D.R. Heath, J.K. Hogan, B.L.M.." Devel - opmental expression of 2ar(osteopontin) andSPARC(osteonectin) RNA as revealed by *in situ* hybridization. " *J. Cell. Biol. 106*:441 - 450, 1988.
9. Senger, D.R. Peruzzi, C.A. Papadopoulos, A.. " Elevated expression of secreted phosphoprotein I(osteopon - tin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. " *Anticancer Res.* **9**:1291 - 1300, 1989.
10. Mark, M.P. Prince, C.W. Oosawa, T. Gay, S. Bronkers, A.L.J.J. Butler, W.T.. " Immunohistochemical demon - stration of a 44kD phosphoprotein in developing rat bones. " *J. Histochem. Cytochem.* **35**:707 - 717, 1987.
11. Gerstenfeld, L.C. Gotoh, Y. McKee, M.D. Nanci, A. Landis, W.J.Glimcher, M.J.. " Expression and ultrastructural immunolocalization of a major 66kDa phosphoprotein sythesized by chicken osteoblasts during mineralization *in vitro*. " *Anat. Rec.* **228**:93 - 103, 1990.
12. Kasugai, S. Todescan, R.Jr. Nagata, T. Yao, K - L. Butler, W.T. Sodek, J.. " Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tis - sue formation by adult rat bone marrow cells *in vitro* : Inductive effects of dex - amethasone on the osteoblastic phyno - type. " *J. Cell. Physiol.* **147**:111 - 120, 1991.
13. Franzen, A. Oldberg, A. Solursh, M.." Possible recruitment of osteoblastic precursor cells from hypertrophic chon - drocytes during initial osteogenesis in cartilaginous limbs of young rats. " *Matrix* **9**:261 - 265, 1989.
14. Ikeda, T. Nomura, S. Yamaguchi, A. Suda, T. Yoshiki, S.." *In situ* hybridization of bone matrix proteins in undecalcified adult rat bone sections. " *J. Histochem. Cytochem.* **40**:1079 - 1088, 1992.
15. Mark, M.P. Butler, W.T. Prince, C.W. Finkelman, R.D. Ruch, J.V.." Devel - opmental expression of 44kD bone phos - phoprotein (osteopontin) and bone gamma - carboxyglutamic acid(Gla) con - taining protein(osteocalcin) in calcifying tissues of rat. " *Differentiation* **37**:123 - 136, 1988.
16. Patarca, R. Freeman, G.J. Singh, R.P. Wei, F - Y, Durfee, T. Blattner, F. Regnier, D.C. Kozak, C.A. Mock, B.A. Morse, H.C.III Jerrells, T.R. Cantor, H.. " Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation(Eta - 1) gene. " *J. Exp. Med.* **170**:145 - 161, 1989.
17. Miyazaki, Y. Setoguchi, M. Yoshida,

S. Higuchi, Y. Akizuki, S.Yamamoto, S.. " The mouse osteopontin gene. Expression in monocytic lineage and complete nucleotide sequence. " *J. Biol. Chem. 265*:14432 - 14438, 1990.

18. Arzate, H. Alvarez - P rez, M.A. Aguilar - Mendoza, M.E. Alvarez - Fregoso, O.. " Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*. " *J. Periodont. Res.* **33**:249 - 258, 1998.
19. Fisher, L.W. Whitson, S.W. Avioli, L.V. Termine, J.D.. " Matrix sialoprotein of developing bone. " *J. Biol. Chem*. **258**:12723 - 12727, 1983.
20. McKee, M. Zalzal, S. Nanci, A.. " Extracellular matrix in toothcementum and mantle dentin: localization of osteo - pontin and other noncollagenous protein, plasma proteins and glycoconjugates by electron microscopy. " *Anat. Rec.* ***245***:293 - 312, 1996.
21. Nishimura, K. Hayashi, M. Matsuda, K. Shigeyama, Y. Yamasaki, A. Yamaoka, A.. " The chemoattractive potency of periodontal ligament, cementum, and dentin for human gingivalfibroblasts. " *J. Periodont. Res.* ***24***:146 - 148, 1989.
22. MacNeil, R.L. Berry, J. D'Errico, J. Strayhorn, C. Piotrowski, B.Somerman, M.J.. " Role of two mineral - associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein during cementogene - sis. " *Conn. Tiss. Res.* ***33***:323 - 329, 1995.
23. Reinholt, F.P. Hultenby, K. Oldberg, A. Heineg rd, D.. " Osteopon - tin - a possible anchor of osteoclasts to bone. " *Pro. Fin. Dent. Soc.* ***88***(Suppl. I):451 - 462, 1990.
24. MacNeil, R.L. Berry, J. D'Errico, J. Strayhorn, C. Somerman, M.J.. " Local - ization and expression of osteopontin in mineralized and nonmineralized tissues of the periodontium. " *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ***760:***166 - 176, 1995.
25. Cho, M.I. Matsuda, N. Lin, W.L. Moshier, A. Ramakrishnan P.R.. " *In vitro* formation of mineralized nodules by peri - odontal ligament cells from the rat. " *Calcif. Tissue Int.* ***50***:459 - 467, 1992.
26. Lekic, P. Sodek, J. McCulloch, C.A.G.. " Osteopontin and bone sialopro - tein expression in regenerating rat peri - odontal ligament and alveolar bone. " *Anato. Rec.* **244**:50 - 58, 1996
27. Kasugai, S. Nagata, T. Sodek, J.. " Temporal studies on the tissue com - partmentalization of bone sialoprotein(BSP), osteopontin(OPN), and SPARC protein during bone forma - tion *in vitro*. " *J. Cell. Physiol.* ***152***:467 - 477, 1992.
28. Nagata, T. Todescan, R.Jr. Goldberg, H.A. Zhang, Q. Sodek, J.. " Sulphation of secreted phosphoprotein 1(SPP - 1, osteopontin) is associated with mineralized tissue formation. " *Biochem. Biophys. Res. Commun. 165*:234 - 240, 1989.
29. Wrana, J.L. Kubota, T. Zhang, Q. Overall, C.M. Aubin, J.E. Butler, W.T. Sodek, J.. " Regulation of transforming - sensitive secreted phosphoprotein(SPP1/osteopontin) expression by transforming growth fac - tor - β Comparisons with expression of SPARC(secreted acidic cysteine - rich

protein). "*Biochem. J.* ***273***:523 - 531, 1991.
30. Chen, J. Shapiro, H.S. Sodek, J.. " Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissue. "*J. Bone Miner. Res.* ***7***:987 - 997, 1992
31. Chen, J. Singh, B.B. Mukherjee, Sodek, J.. Developmentalexpression of osteopon - tin(OPN) mRNA in rat tissues : Evidence for a role of OPN in bone formation and resorp - tion. "*Matrix* ***13***:113 - 123, 1993.
32. Takano - Yamamoto, T. Takemura, T. Kitamura, Y. Nomura, S.". Site - specific expres - sion of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by *in situ* hybridization in rat periodontal liagament during physiological tooth movement. "*J. Histochem. Cytochem.* ***42***:885 - 896, 1994.
33. Weinreb, M. Shinar, D. Rodan, G.A.. " Different pattern of alkalinephosphatase, osteopontin and osteocalcin in developing rat bone visualized by *in situ* hybridization. "*J. Bone Min. Res.* ***5***:831 - 842, 1990.
34. Nagata, T. Bellows, C.G. Kasugai, S. Butler, W.T. Sodek, J." Biosynthesis of bone proteins, SPP - 1(secreted phosphoprotein 1,osteopontin), BSP(bone sialoprotein) and SPARC(osteonectin) in association with mineralized tissue formation by fetal rat calvarial cells in culture. "*Biochem. J. 274*:513 - 520, 1991.
35. MacNeil, R.L. D'Errico, J. Ouyang, H. Berry, J. Strayhorn, C. Somerman, M.J.. " Isolation of murine cementoblasts : unique cells or uniquely - positioned osteoblasts? " *Eur. J. Oral Sci.* ***106(suppl 1)***:350 - 356, 1998.
36. MacNeil, R.L. Sheng, N. Stryhorn, C. Fisher, L.W. Somerman, M.J.." Bone sialopro - tein is localized to the root surface during cementogenesis. "*J. Bone Min. Res.* ***9***:1597 - 1606, 1994.
37. D'Errico, J.A. MacNeil, R.L. Takata, T. Berry, J. Strayhorn, C. Somerman, M.J.. " Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, *in situ* and *in vitro*. "*Bone* ***20***:117 - 126, 1997
38. Yao, K.L. Todescan, R. Sodek, J.." Temporal changes in matrix proteins synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. "*J. Bone Miner. Res.* ***9***:231 - 240, 1994.
39. Somerman, M.J. Shroff, B. Foster, R.A. Butler, W.T. Sauk, J.J." Mineral associated adhesion proteins are linked to root formation. "*Proc. Finn. Dent. Soc.* ***88***:451 - 461, 1992.
40. Lang, H. Sch ler, N. Arnhold, S. Nolden, R. Mertens, T." Formation of differntiated tissues *in vivo* by periodontal cellpopulations cultured *in vitro*." *J. Dent. Res.* ***74***:1219 - 1225, 1995.
41. Somerman, M.J. Shroff, B. Agraves, W.S. Morrison, G. Craig, A.M. Denhardt, D.T. Foster, R.A. Sauk, J.J.. " Expression of attachment proteins during cementogenesis. "*J. Biol. Buccale* ***18***:207 - 214, 1990.
42. Bronkers, A.L.J.J. Farach - Carson, M.C. van Waveren, E. Butler, W.T.." Immunolo - calization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation

사진부도(Ⅰ)

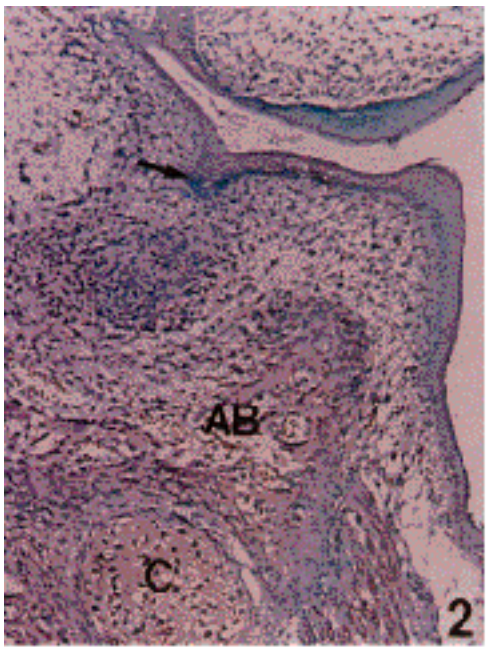

Figure 2

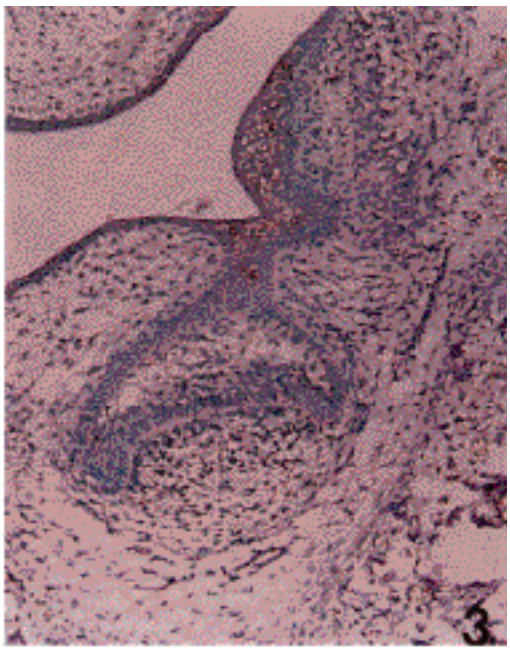

Figure 3

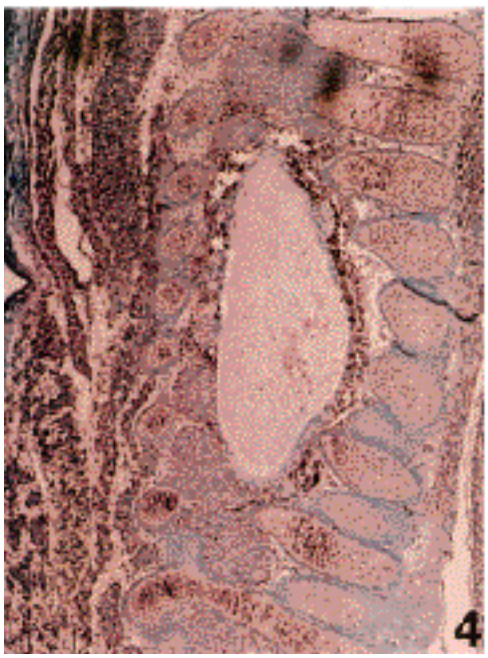

Figure 4

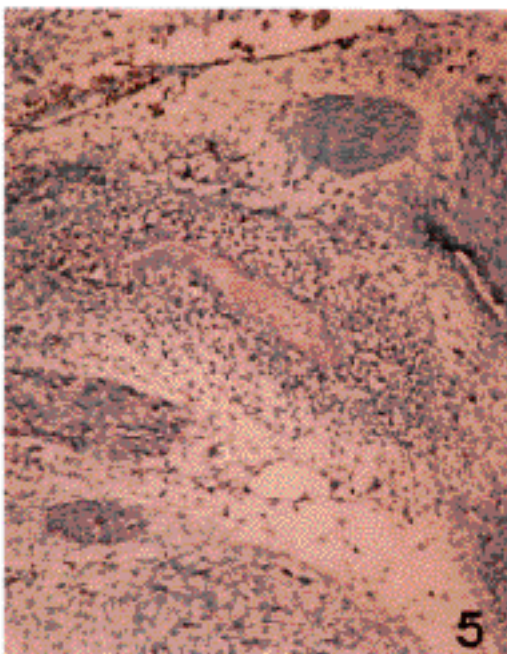

Figure 5

사진부도(Ⅱ)

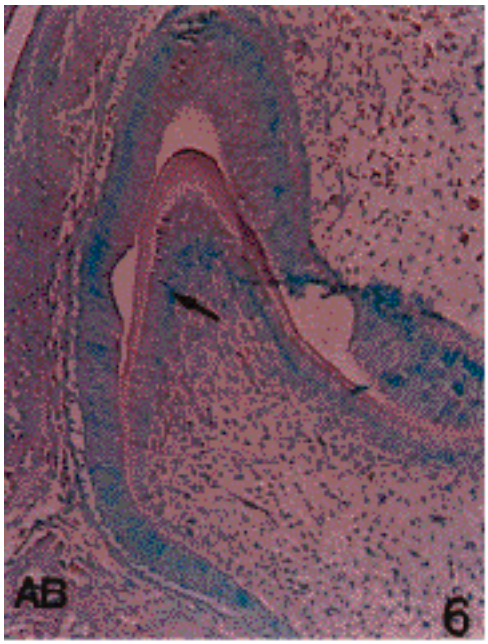

Figure 6

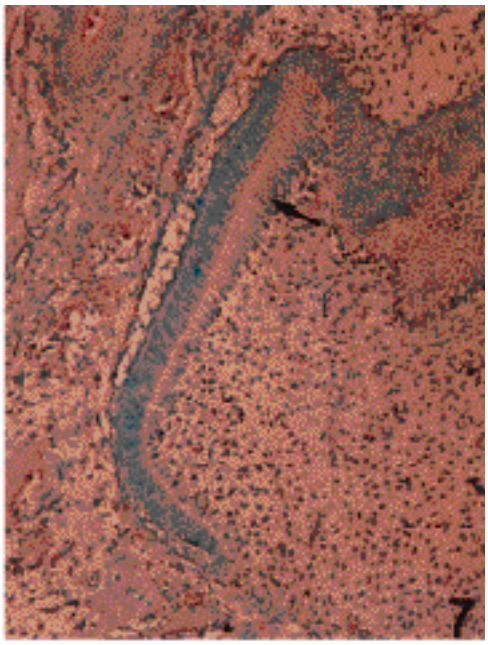

Figure 7

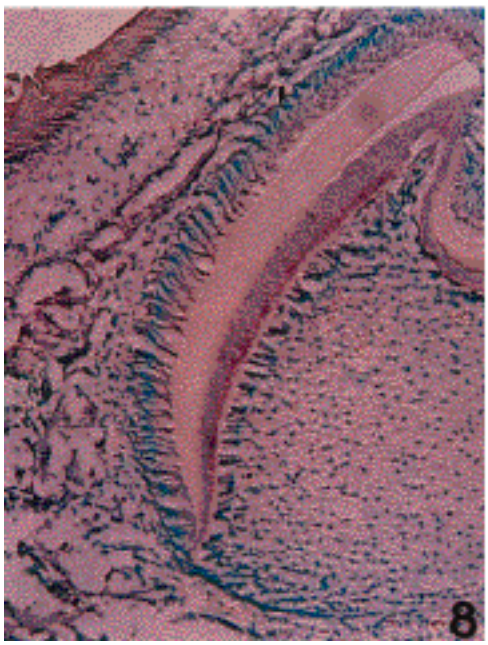

Figure 8

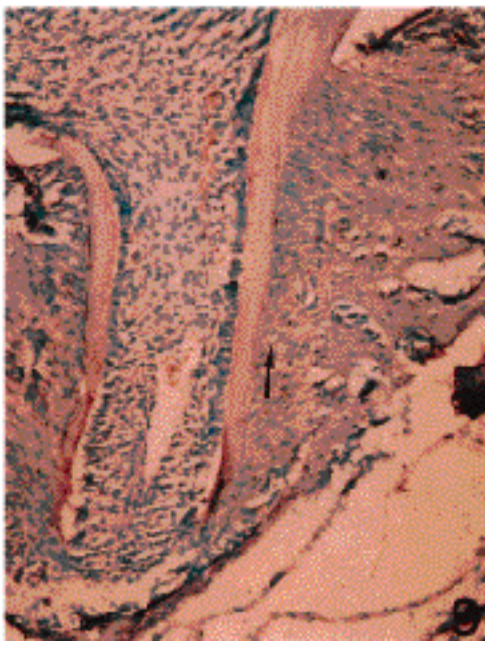

Figure 9

and early cementogenesis in the rat."*J. Bone Miner. Res.* ***9***:833 - 841, 1994.
43. McAllister, B. Narayanan, A.S. Miki, Y. Page, C.." Isolation of afibroblast attachment protein from cementum."*J. Periodont. Res.* ***25***:99 - 105, 1990.
44. Somerman, M.J. Sauk, J.J. Foster, R.A. Dickinson, K. Norris, K.Argraves, W.S.." Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum." *J. Periodont. Res.* ***26***:10 - 16, 1991.
45. Somerman, M.J. Archer, S.Y. Shteyer, A. Foster, R.A.." Protein production by human gingival fibroblasts is enhanced by guanidine EDTA extracts of cementum."*J. Periodont. Res.* ***22***:75 - 77, 1987.
46. McKee, M. Nancy, A. Landis, W.J. Gotoh, Y. Gerstenfeld, L.C.Glimcher, M.J.." Developmental appearance and ultrastructuralimmunolocalization of major 66kDa phosphoprotein in embryonic and post - natal chicken bone."*Anat. Rec.* ***228***:77 - 92, 1990.
47. Chen, J. McCulloch, C.A.G. Sodek, J.." Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison to tissue localization with osteopontin andosteonectin."*Arch. Oral Biol.* ***38***:241 - 249, 1993.

사진부도 설명

Figure 2. Frontal section of tooth germ at bud stage(prenatal day13), labeled by *in situ* hybridization with Digoxigenin labeled mouse osteopontin mRNA probes(x100). Osteopontin expression was intense in developing alveolar bone and cartilage, but tooth bud did not show hybridization signal.

Figure 3. Frontal section of tooth germ at cap stage(prenatal day 13), labeled by *in situ* hybridization(x100). Osteopontin mRNA was not expressed in the dental organ, dental papilla and dental follicle.

Figure 4. Sagittal section of mouse embryo vertebrate region at cap stage(prenatal day 15), labeled by *in situ* hybridization(x100). Osteopontin mRNA transcripts were clearly seen in the developing vertebrate.

Figure 5. Sagittal section of mouse embryo cartilage region at cap stage(prenatal day 15), labeled by *in situ* hybridization(x100). Osteopontin mRNAs were expressed in the developing alveolar bone and osteoblasts.

Figure 6. Frontal section of incisor tooth germ at bell stage(postnatal day 1), labeled by *in situ* hybridization(x100). In tooth germ, osteopontin mRNA expression was intense in preodontoblast and surrounding alveolar bone.

Figure 7. Frontal section of molar tooth germ at bell stage(postnatal day 1), labeled by *in situ* hybridization(x100). In the tooth germ, osteopontin mRNA transcripts were expressed in odontoblasts but not in the mesenchymal cells of the subodontoblastic region.

Figure 8. Frontal section of molar tooth germ at late bell stage(postnatal day 5), labeled by *in situ* hybridization(x100).Osteopontin expression was intense in odon-

toblasts, but ameloblasts did not show hybridization signal.

Figure 9. Frontal section of molar tooth germ at hard tissue formation stage(postnatal day 16), labeled by *in situ* hybridization(x100). Osteopontin was expressed by PDL cells throughout the periodontal region.

- Abstract -

Immunohistochemical Study of the Expression of Bone Morphogenetic Protein(BMP - 7) Following Regenerative Periodontal Surgery

Kyung - Yoon Han[1], Se - Yeol Cho[1], Ki - Jung Lim[1], Heung - Jung Kim[2], Ju - Cheol Park[3], Byung - Ock Kim[1]

Department of Periodontology[1], Department of Oral Anatomy[2], Department of Oral Histology[3],
College of Dentistry, Chosun University

Extracellular matrix component is degraded by enzymes of thematrix metalloproteinases(MMPs). MMPs are produced by both hemopoietic and structural cells. Increased activity of MMP - 3 in periodontium is strongly associated with inflammatory periodontal disease.

The purpose of the present study was to estimate the effect of BMP - 7 on regeneration of periodontium. The optical density was measured by microwell plate reader at 450 nm.The difference of the optical density and the relative activity ofMMP - 3 according to the concentration were statistically analyzed by one way ANOVA.

The results were as follows:

1. Tetracycline - HCl showed the tendency to inhibit the activity of MMP - 3 at the concentration lower than 25 µg/ml.
2. Doxycycline - HCl inhibited signifi - cantly the activity of MMP - 3 at the concentration lower than 100 µg/ml.
3. Minocycline - HCl inhibited the activity of MMP - 3 at the concentration in the range of 10 to 200 µg/ml.

Within the limit of the present study, the above results suggested that bone morpho - genetic protein - 7 may play a important role in development of periodontium.