

피브린 결합능을 가진 합성 펩타이드의 치주인대 세포에 대한 생물학적 영향

이주아¹, 구 영^{1*}, 박윤정², 구기태¹, 김태일¹, 설양조¹, 이용무¹, 류인철¹, 정종평¹

1. 서울대학교 치의학대학원 치주과학교실
2. 서울대학교 치의학대학원 두개악안면재건과학교실

The biologic effect of fibrin-binding synthetic oligopeptide on periodontal ligament cells

Ju-A Lee¹, Young Ku^{1*}, Yoon-Jeong Park², Ki-Tae Koo¹, Tae-Il Kim¹, Yang-Jo Seol¹, Yong-Moo Lee¹, In-Chul Rhyu¹, Chong-Pyoung Chung¹

1. Department of Periodontology, School of Dentistry, Seoul National University

2. Craniomaxillofacial Reconstructive Science Major, School of Dentistry, Seoul National University

ABSTRACT

Purpose: Fibronectin(FN), one of the major components of ECM, mediates wide variety of cellular interactions including cell adhesion, migration, proliferation and differentiation. In this study, we used synthetic peptides based on fibrin binding sites of amino-terminal of FN and evaluated their biologic effects on periodontal ligament(PDL) cells.

Materials and methods: PDL cells were cultured on synthetic oligopeptides coated dishes and examined for cell adhesion, proliferation via confocal microscope. For detection of ERK1/2, cells were plated and Western blot analysis was performed.

Results: PDL cells on synthetic oligopeptide coated dishes showed enhanced cell adhesion and proliferation. Western blot analysis revealed increased level of ERK1/2 phosphorylation in cells plated on FN fragment containing fibrin-binding domain(FF1 and FF5) coated dishes.

Conclusion: These results reveals that FN fragment containing fibrin-binding domain possess an enhanced biologic effect of PDL ligament cells. (*J Korean Acad Periodontol 2009;39:45-52*)

KEY WORDS: Fibronectin; periodontal ligament cells; fibrin-binding domain; ERK1/2.

서론

치주 질환은 점진적인 치주조직의 파괴를 특징으로 하는 질환으로써, 파괴된 치주조직의 구조적 및 기능적 재건을 그 치료 목적으로 하고 있다. 이 치료 과정에는 치은 결합 조직, 치조골, 백악질과 치주인대(periodontal ligament, PDL) 사이의 복잡한 상호 작용이 일어나며, 그 중에서도 세포들과 치은 결합 조직 내 세포외기질 구성 성분과의 소통이 중요한 역할을 한다^{1,2}. 상호 작용에 관여하는 많은 세포와 세포 외 기질 중에서도 치주 인대 세포는 조골세포와 조

백세포로 분화 가능한 다분화성 줄기 세포를 포함하고 있으며, 치주조직의 치유 및 재생에 있어서 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다^{3,4}. Fibronectin(FN)은 세포외기질의 주요 당 단백질의 하나로 integrin과 결합하여 extracellular signaling kinase(ERK1/2)를 자극하며, 그 결과 세포의 생존, 성장, 사멸, 분화 등 다양한 세포 반응을 조절하게 된다⁵. 또한 안정된 세포 주위 조직을 형성하며, 세포의 부착(adhesion), 화학주성, 이동, 창상치유, 염증반응 등에서 중요한 역할을 하고 있다⁶. FN 분절(fragment)은 건강한 치주인대에서도 발견할 수 있지만 염증이 있는 경우 훨씬 더 높은 농도로 발견되며, 이는 창상 치유 및 조직 재생 과정에 관여하는 것으로 생각된다⁷. FN은 두 개의 유사한 250 kDa subunit이 두 개의 이황결합으로 연결된 이합체(dimer) 형태로 각 단위체는 세 가지 type으로 분류되는 unit의 반복적 배열로 이루어지며, 12개의 type I repeats, 2개의 type II repeats, 15~17개의 type III repeats

Correspondence: Dr. Young Ku
Department of Periodontology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University, 28 Yeongon-dong, Chongno-ku, Seoul, 110-744, Korea.
E-mail: guy@snu.ac.kr, Tel: 02-2072-3182, Fax: 02-744-0051
Received: Jan, 23, 2009; Accepted: Mar, 6, 2009

로 구성되어 있다. FN은 세포의 기질과 세포 내 골격을 연결하는 세포 표면상의 수용체(receptor)인 다양한 integrin의 ligand가 될 수 있으며⁸⁾, 이 외에도 피브린 결합 영역, 젤라틴/콜라겐 결합 영역, 헤파린 결합 영역을 포함하고 있다. 이들 중 피브린 결합 영역은 N-terminal과 C-terminal 부위에 존재하며 이 중 N-terminal의 피브린 결합 부위가 중요 기능을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다⁹⁾. FN의 다양한 결합 부위 중에서도 아미노 말단에 가까운 Glutamyl(Gln) 잔기는 활성화된 혈액응고인자 factor13 (plasma transglutaminase)의 transglutamination 위치로 작용하여 FN을 피브린, 피브리노겐, FN과 교차 결합하도록 유도한다. Plasma FN은 혈액응고 과정에서 피브린과 함께 일시적인 scaffold 역할을 하는 fibrin-FN matrix의 주요 구성원이자 조직재생 과정에서 이 기질을 대체하는 육아 조직의 기본 요소로 작용하며, 이 때 FN과 피브린 간 결합이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 그리고 이와 같은 초기 상처 치유 과정에서의 fibrin-FN 교차결합은 조직 재생과 관련한 세포의 부착과 증식, 이동을 촉진시킬 수 있다¹¹⁾. 1980년대 이후 FN의 전체 분자를 이용한 조직 재생술이 많이 이용되어 왔으나, 거대 분자를 사용하는 경우는 면역반응, 분해효소에 의한 무작위 분절화 등의 문제점들이 지적되었다^{12,13)}. 따라서 최근에는 주요 세포부착 부위를 포함하는 짧은 FN 분절을 이용한 시도들이 보고되었으며¹⁴⁾ 이들 중 RGD와 PHSRN 서열을 포함한 합성 올리고펩타이드를 이용하여 생체재료의 표면개질에 이용한 결과, FN 전체 분자를 이용한 경우와 비교하여 생물학적 효과가 비견할 만하였다는 보고가 있었다¹⁵⁾.

최근까지 RGD와 PHSRN 서열의 integrin 결합 부위를 포함한 합성 펩타이드에 대한 연구는 많이 이루어지고 있지만, 피브린 결합 부위에 대한 연구는 많이 이루어지지 못하고 있는 상황이다. 이 논문의 목적은 FN의 피브린 결합 부위를 포함하는 합성 올리고펩타이드를 제작하여 이들 절편이 치주 조직의 주된 구성 성분으로 작용하는 치주인대 세포의 부착, 증식에 미치는 영향을 알아보는 것이다.

재료 및 방법

1. 펩타이드 제작

FN의 피브린 결합 서열을 포함한 올리고펩타이드를 solid-phase peptide synthesizing system(Applied Biosystems)

로 80% 이상의 최종 coupling 효율을 가진 표준 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chemistry를 이용하여 제작하였으며, 제작된 펩타이드는 mass spectroscopy와 HPLC로 특성화하고 분석하였다. 제작된 올리고펩타이드의 아미노산 서열은 다음과 같다: FF1(CYDNGKHQ), FF3(CFDKYTGNTYRV), FF5(CTSRNRCNDQ). 이들 3개의 oligopeptide는 FN human(FINC-HUMAN: P02751¹¹⁾)의 amino 말단 피브린 결합 서열에 따라서 제작되었으며, FF1의 서열은 type I repeat I에서, FF3는 type I repeat II에서, 그리고 FF5는 type I repeat IV-V에서 유래되었다.

2. 세포 부착 검사

1) 세포 배양 접시에 펩타이드 도포

합성된 올리고펩타이드 FF1, 3, 5를 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4 ; 13 mM NaCl, 0.2 mM KCl, 0.8 mM Na₂HPO₄, 0.2 mM KH₂PO₄)을 이용하여 100 μM로 희석시킨 후 syringe filter로 여과시켰다. 24-well Lab-Tek II chamber slide(Nalgen, Nunc Internation, Naperville, IL.) 각각의 well에 100 μM의 FF1, FF3, FF5를 50 μl씩 각각 도포하였으며, 96-well chamber slide 각각의 well에는 10 μl씩 도포하였다. Clean bench에서 펩타이드가 도포된 slide를 하룻밤 동안 건조시킨 후 다음 실험을 진행하였다.

2) 세포 분주

24시간 동안 serum starvation 시킨 PDL 세포를 TE (Trypsin-EDTA)를 이용하여 탈리시킨 후 hemacytometer (Marienfeld)를 이용하여 그 수를 측정하였다. 0.1% BSA가 포함된 α-MEM 배양액 속에 1×10⁴ cells/well로 분주하였으며, 세포가 충분히 부착되도록 37°C, 5% CO₂ 환경하에서 12시간 동안 배양하였다. 각각의 펩타이드가 도포된 접시에 배양한 세포를 실험군으로, 아무 것도 도포되지 않은 접시에 배양한 세포를 대조군으로 실험을 진행하였다.

3) Confocal 관찰을 위한 염색

24-well chamber에 붙은 PDL 세포를 4% paraformaldehyde를 이용하여 탈리시킨 후 10분 정도 실온에서 고정하였다. 고정된 세포는 PBS를 이용하여 2회 세척하고 0.1% Triton-X로 10분 동안 처리하여 세포막을 확장시켰다. PBS로 10분 정도 다시 처리한 후, Hoechst 33342(5

$\mu\text{l/well}$)와 Alexa Fluor 546-Phalloidin($5 \mu\text{l/well}$), PBS ($300 \mu\text{l/well}$)로 20분 동안 실온에서 처리하여, 핵과 액틴 마이크로필라멘트를 염색한 후 mounting을 시행하였다. 형광 이미지는 laser scanning microscope(LSM-GB200, Olympus, Japan)을 이용하여 확인 및 촬영하였다.

3. MTT 검사

PDL 세포가 붙은 96-well chamber에 2 mg/ml 농도의 MIT 용액(Promega, Madison, WI.)을 각각의 well마다 $20 \mu\text{l}$ 씩 넣어 측정하였다. 3시간 배양한 후 용액을 제거하고, 흡광도는 540 nm에서 측정하였다.

4. ERK1/2 활성을 알아보기 위한 Western blot analysis

24-well plate에 $10 \mu\text{m}$ 의 미리 제작된 합성 올리고펩타이드를 도포하고, PDL 세포(5×10^5 cells/well)를 분주한 후, 1시간 동안 37°C , 5% CO_2 chamber에서 배양하였다. 부착된 세포는 30분 동안 얼음 위에서 pH 7.4의 modified radioimmunoprecipitation(RIPA) buffer(1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM HEPES, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM orthovanadate, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, $10 \mu\text{g/ml}$ aprotinin, and $5 \mu\text{g/ml}$ leupeptin)를 이용하여 녹여낸 후 15분 동안 4°C , $13,000 \times g$ 에서 원심 분리시켰다. 단백질 농도는 Bradford reagent(Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA.)를 이용하여 측정하였다. Phosphor-specific ERK1/2 antibody $20 \mu\text{g}$ 을 cell lysate에 첨가한 후 4시간 동안 4°C 에서 배양하였다. 일차 항체에 대한 단백질 결합은 horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody을 이용하여 확인하고 enhanced chemiluminescence detection system을 이용하여 시각화시켰다. Calibrated imaging densitometer를 이용하여 densitometric 분석을 시행하였다.

5. 통계 분석

각각의 실험은 4번씩 반복 실행하였다. 통계분석은 mean \pm standard deviation(mean \pm SD)으로 실행하였으며, ANOVA with Turkey's multiple comparison test로 95% 신뢰도로 분석하였다.

결과

1. FF1, FF3, FF5의 세포 부착

공초점 현미경을 통해 Hoechst 33342로 염색된 푸른 핵과 Alexa Fluor 546-Phalloidin로 염색된 붉은 액틴 필라멘트를 관찰할 수 있었다. 각각의 합성 올리고펩타이드들은 대조군과 비교하여 더 많은 세포부착이 관찰되었다. FF1에 비해 FF3와 FF5은 부착된 세포 수가 더 많았으며, 액틴 필라멘트가 잘 발달된 양상을 보였다(Fig. 1).

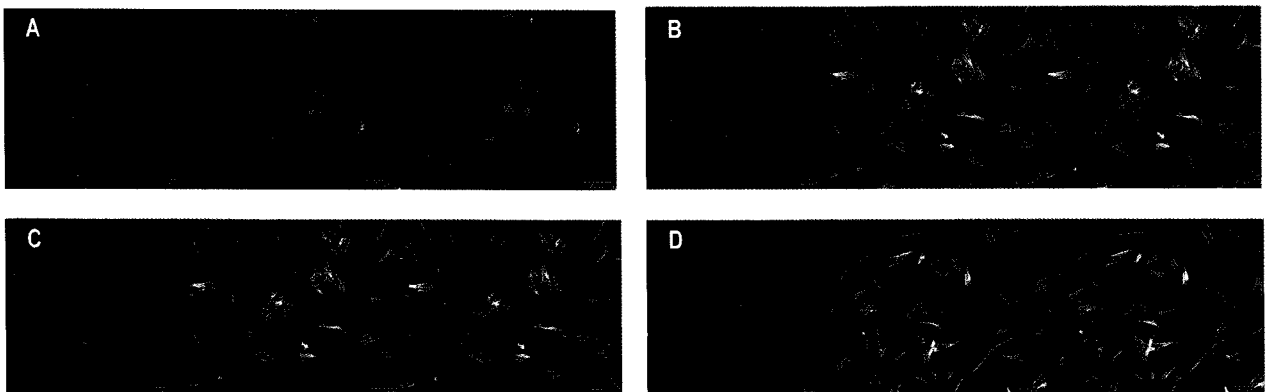


Figure 1. PDL cell attachment using confocal laser microscopy. Nuclei appear blue, and actin filaments are red. (A) NT, (B) FF1, (C) FF3, (D) FF5

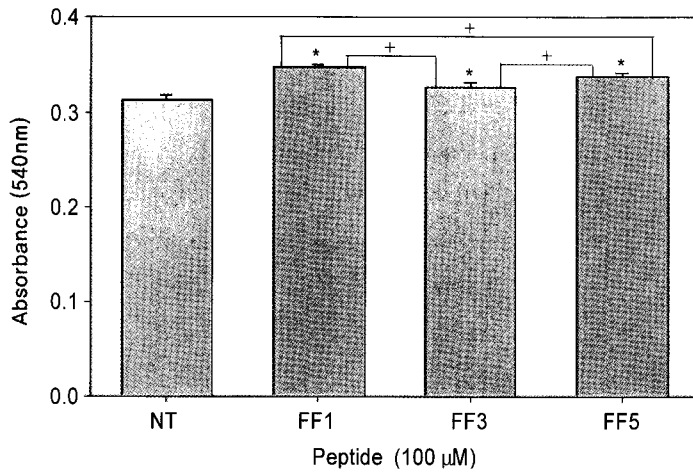


Figure 2. MTT assay of PDL cell attachment in 1 hour. *denotes a statistically significant differences between control and test group ($P < 0.05$), + denotes statistically significant differences between test groups ($P < 0.05$).

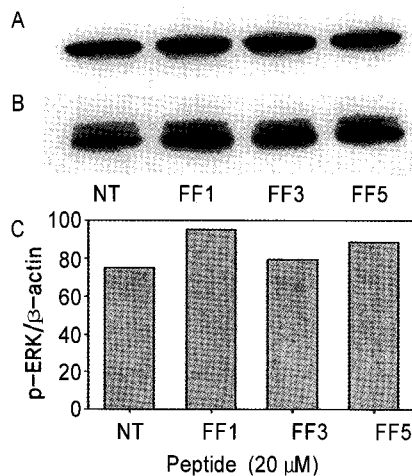


Figure 3. Activation of ERK1/2 in PDL cells cultured on synthetic oligopeptide. Phosphorylation levels of p-ERK1/2 were quantified by densitometry. Immunoblotting after treatment with 20 μM of each peptide. (A) Phosphorylated ERK1/2, (B) β-actin, (C) The levels of p-ERK1/2 were quantified by densitometric scanning

2. MTT assay

MTT 검사 결과는 대조군과 비교 시 3가지 펩타이드 모두 흡광도가 통계학적으로 유의할 만한 수준으로 증가함을 알 수 있었다($P < 0.05$). 3가지 대조군을 서로 비교하였을 때에도 각각의 펩타이드군 간에도 유의할 만한 차이를 발견할 수 있었으며, 그 순서는 FF1, FF5, FF3 순이었다($P < 0.05$)(Fig. 2).

3. ERK1/2 activation에 대한 Western blot analysis

ERK1/2의 활성도를 반영하는 phosphorylated ERK (p-ERK1/2)는 각각의 펩타이드를 첨가한 경우 증가됨을 발견할 수 있었다. 대조군과 비교 시 세 종류의 펩타이드 모두

그 활성도가 증가함을 알 수 있었으며, 특히 FF1과 FF5의 경우 현저하게 증가함을 발견할 수 있었다(Fig. 3).

고찰

FN은 세포외기질과 다양한 상호작용을 매개하며 세포의 부착, 이동, 증식, 분화에 중요한 역할을 담당한다. 이러한 기능을 가지고 있는 FN을 조직재생에 적용하여 왔으며, 그 대부분은 FN 전체 분자를 이용하는 것이었다. 그러나 전체 분자를 이용하는 경우 분해효소에 의한 비특이적 절편화, 주위 세포와의 불특정한 결합, 면역적인 문제, 소독의 문제, integrin의 blocking 효과 등의 여러 가지 문제점이 제기되었다^{12,13}. 따라서 최근에는 원하는 부위의 FN 절편을 제작하고 조직재생 및 생체재료 표면개질에 활용하고자 하는 시도들이 있어 왔다. 특히, 세포부착의 주요부위인 10번째

type III repeats의 RGD와 인접한 9번째 type III의 PHSRN 염기서열을 포함하는 짧은 분절의 절편을 합성 또는 유전자재조합법을 이용하여 얻은 후 이를 조직재생 및 생체재료 표면 개질에 적용한 보고가 있었다¹⁶⁾.

이와 같은 세포부착 부위 이외에도 FN에는 헤파린 결합, 콜라겐/젤라틴 결합, 피브린 결합 부위 등의 다양한 생물학적 기능을 담당하는 부위가 유전자재조합법으로 얻은 단백질 절편을 이용하여 밝혀졌다. 이 중 피브린 결합 부위는 N-terminal type I repeats 1-5와 C-terminal type I repeats 10~12 두 종류로 구성되어 있으며, 이 중 N-terminal의 결합 부위가 대부분의 결합에 기여하며, C-terminal 결합 부위는 이러한 상호 작용을 강화시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 피브린과 FN의 결합은 세포부착 및 이동에 중요한 역할을 하고, 외상이나 염증 이후 순환 혈액으로부터 피브린을 제거하는 대식세포의 역할에도 관여한다고 알려져 있다. 그러나 피브린 결합 부위의 짧은 분절이 치주 조직을 구성하는 세포들에 어떤 역할을 하는지는 아직까지 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 따라서 이 연구에서는, 피브린 결합 부위에 포함되는 짧은 절편을 합성하여 이들 펩타이드가 치주인대 세포의 부착, 증식에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 치주인대 세포는 치주조직의 재생, 창상 치유, 유지에 있어서 세포와 세포외기질의 상호작용에 관여하는 가장 중요한 기능을 담당하는 세포이며, 특히 신생치조골 및 신생백악질로 분화가 가능한 다분화성 중배엽 기원의 줄기세포로 알려져 있다.

앞서 언급한 바와 같이 이 연구에서는 FN의 N-terminal의 피브린 결합 부위를 이용하였는데, 이 부위의 생물학적 기능에 관해서는 Williams 등이 자세히 규명한 바 있다¹⁷⁾. 특히 glutamyl residue(Gln)는 plasma transglutaminase (factor XIIIa)가 중계하는 피브린의 α -chain에 위치한 lysyl 잔기와의 covalent cross-linking 반응이 일어나서 피브린 혈병 내로의 세포의 부착 및 이동에 있어서 중요 기능을 하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 조직 손상이 일어나면 피브린과 혈장 FN으로 이루어진 혈병이 형성되어 혈액 공급을 유지시켜 주며 창상 치유를 위한 provisional matrix 기능을 하게 된다¹⁹⁾. 여기에 피브린이 축적되고 혈장 FN과 피브린의 covalent-crosslinking이 이루어지면 조섬유세포의 부착, 증식, 이동이 혈병 안으로 이루어진다^{20,21)}. 그 결과 세포성 FN이 임시시계(temporary scaffold)로 작용하여 지속적인 세포와 육아 조직의 형성을 이끌어 내어 창상 치유

가 일어나는 것이다²³⁾. 즉, 창상 치유를 위해서는 피브린과 혈장 내 FN의 결합이 이루어져야만 하고 이에 따르는 치주인대 세포의 피브린 matrix 내로의 이동도 가능한 것이다^{22,23)}. 이번 실험의 결과에 따르면, 3가지 합성된 펩타이드 모두에서 부착과 증식이 증가함을 발견할 수 있었다. 공초점 레이저 현미경 관찰 결과 세 가지 펩타이드 모두에서 세포수의 증가와 세포의 모양 변화를 관찰할 수 있었다. FF1의 경우 대조군에 비해 차이가 별로 없었으나, FF3와 FF5에서는 부착세포수의 현저한 증가와 filopodia-like 한 세포의 모양 변화가 보였다. 세포의 증식 정도를 알아보기 위한 MTT 검사 결과 합성 펩타이드 모두에서 세포의 증식 대조군과 비교 시 증가함을 알 수 있었으며 각각의 펩타이드 간에도 FF1, FF5, FF3의 순으로 큰 차이를 발견할 수 있었다. 실험 결과 이 펩타이드들은 치주인대 세포의 증식 및 부착에 도움이 될 것으로 생각되며 창상 치유 초기 단계에 있어서 크게 도움이 될 것으로 생각된다.

세포외기질 단백질은 외부 환경변화에 따라 세포 행동을 변화시키는 mitogen activated protein kinase(MAPK) 등의 signaling pathways를 활성화 시킬 수 있다²⁴⁾. 그 중 ERK1/2은 가장 잘 알려진 MAPK families 구성원 중 하나로 몇 가지 성장 인자와 mitogens으로 활성화되어 세포의 증식 및 분화를 유도할 수 있다^{25,26)}. 1997년 Takeuchi 등은 MC3T3-E1 조골양세포가 type I 콜라겐과 결합할 경우 ERK1/2을 활성화시킴을 발견하였으며²⁷⁾, 2002년 Xiao 등은 ascorbic-acid dependent 콜라겐 합성에 의한 osteoblastic-specific gene expression에 있어서 ERK1/2이 중요한 역할을 함을 발표하였다²⁸⁾. 2007년 Mimori 등은 치주인대 세포의 조골세포로의 분화에 미치는 영향에 관한 연구에서 type I 콜라겐과 치주인대 세포를 함께 배양했을 경우 ERK1/2의 phosphorylation이 증가함을 발표하였다²⁹⁾. 지금까지의 연구 결과에 의하면 ERK1/2 signaling은 치주조직의 재생 및 치주인대 세포의 조골세포로의 분화 유도에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있으며, 이번 연구에서 사용한 피브린 결합 부위를 포함한 절편 중 일부의 경우 치주인대 세포의 증식을 이끌어 낼 수 있었고 ERK1/2을 활성화시킬 수 있는 외부 인자로 작용할 수 있을 것이다.

2002년 Kim 등³⁰⁾은 FN의 RGD-PHSRN 서열을 포함한 합성 펩타이드를 이용한 조골양 세포 실험에서, 10 μ M 이상 농도의 펩타이드를 사용했을 경우 조골양세포 부착, 분화, MAPK 활성화 등이 전체 FN을 사용한 경우와 유사함을 발

표하였다. 이번 실험에서 사용한 피브린 결합 부위를 포함한 합성 올리고펩타이드의 경우 조골양 세포에 영향을 끼칠 수 있는 적정 농도에 관한 연구는 아직까지 이루어지고 있지 않고 있으나, integrin 결합 부위를 포함한 합성 올리고펩타이드와 비교하여 조금 더 높은 농도인 100 μM의 합성 올리고펩타이드를 사용하여 그 효과를 비교해 보았다.

이번 실험 결과 공초점레이저를 이용한 치주인대 세포의 부착, 형태 변화, 성장 관찰 실험에서는 FF3 및 FF5 펩타이드를 도포한 경우 대조군과는 확연히 차이가 나는 변화를 관찰할 수 있었으나, FF1을 사용한 경우 그 차이가 크지 않음을 발견할 수 있었다. MTT 검사 및 p-ERK 활성화도 검사의 경우 FF1과 FF5를 도포한 경우 활성화도가 크게 증가함을 발견할 수 있었다. 각각의 펩타이드 기능에 대한 명확한 분석이 이루어지지 않은 만큼 각각의 실험에서 차이가 나는 정확한 이유를 알 수는 없지만, 공초점현미경을 이용한 세포의 성장 실험의 경우 12시간의 배양 시간을 거쳤고 MTT 검사의 경우 3시간, p-ERK1/2의 경우 1시간의 배양 시간을 거쳤으므로 각각의 펩타이드가 세포의 초기 부착에 미치는 영향이 시간 경과에 따라 달라지는 것으로 짐작된다. 즉 FF1의 경우 세포의 초기 부착을 크게 증가시키는 기능이 있는 반면, FF3의 경우 시간이 경과한 후 증식 및 활성화에 영향을 미치는 것으로 생각된다. FF5의 경우 부착 및 증식 모두에 영향을 끼치는 것으로 생각된다.

이 연구의 한계 내에서 FN의 피브린 결합 부위 절편은 치주인대 세포의 부착, 증식 및 분화에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 이는 치주조직의 창상 치유과정에 치주인대 세포의 생물학적 활성화에 작용함으로써, 창상의 치유촉진 및 치주조직 재생에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다. 또한 치주조직 재생에 사용되는 생체재료의 표면개질용 물질로 활용될 수 있을 것으로 사료되어 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 하겠다.

참고문헌

1. Damsky CH. Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and bone remodeling. *Bone* 1999;25: 95-96.
2. Embery G, Waddington RJ, Hall RC, Last KS. Connective tissue elements as diagnostic aids in periodontology. *Periodontol* 2000;24:193-214.

3. Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol* 2001;72:314-323.
4. Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.
5. Magnus KM, Deane FM. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1363-1370.
6. Kapila YL, Lancero H, Johnson PW. The response of periodontal ligament cells to fibronectin. *J Periodontol* 1998; 69:1008-1019.
7. Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I. Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins-tenascin and ED sequence-containing form of cellular fibronectin-in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 1991;70:19-26.
8. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000;275:21785-21788.
9. Agueda AR, Jean ES, Leslie IG. Comparison of the fibrin-binding activities in the N- and C-termini of fibronectin. *Biochem J* 1999; 338:375-386.
10. Sousa SR, Lamghari M, Sampaio P, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA. Osteoblast adhesion and morphology on TiO2 depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin. *J Biomed Mater Res A* 2008;84:281-290.
11. Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci* 1997;110:861-870.
12. Grzesik WJ, Ivanov B, Robery FA, Southerland J, Yamauchi M. Synthetic integrin-binding peptides promote adhesion and proliferation of human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res* 1998;77:1606-1612.
13. Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, et al. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem* 2000;1:107-114.
14. De Giglio E, Sabbatini L, Colucci S, Zamboni G. Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties of RGD-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates. *J Biomater Sci Polymer Ed*, 2000;10: 1073-1083.
15. Ku Y, Chung CP, Jang JH. The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fi-

- bronectin and vitronectin on cell behavior. *Biomaterials* 2005;26:5153-5157.
16. Park JW, Lee SG, Choi BJ, Suh JY, Effects of a cell adhesion molecule coating on the blasted surface of titanium implants on bone healing in the rabbit femur. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:533-541.
 17. Williams MJ, Phan I, Harvey TS, et al. Solution structure of a pair of fibronectin type 1 modules with fibrin binding activity. *J Mol Biol* 1994;235:1302-1311.
 18. Blystone SD, Weston LK, Kaplan JE. Fibronectin dependent macrophage fibrin binding. *Blood* 1991;78:2900-2907.
 19. Corbett SA, Lee L, Wilson CL, Schwarzbauer JE. Covalent cross-linking of fibronectin to fibrin is required for maximal cell adhesion to a fibronectin-fibrin matrix. *J Biol Chem* 1997;272: 24999-25005.
 20. Grinnel F, Feld M, Minter D. Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell* 1980;19:517-525.
 21. Corbett SA, Wilson CL, Schwarzbauer JE. Changes in cell spreading and cytoskeletal organization are induced by adhesion to a fibronectin-fibrin matrix. *Blood* 1996;88: 158-166.
 22. Clark RA, Lin F, Greiling D, An J, Couchman JR. Fibroblast invasive migration into fibronectin/fibrin gels requires a previously uncharacterized dermatan sulfate-CD44 proteoglycan. *J Invest Dermatol* 2004;122:266-277.
 23. Knox P, Crooks S, Rimmer CS. Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. *J Cell Biol* 1986;102:2318-2323.
 24. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996;84:345-357.
 25. Zhu X, Assoian RK. Integrin-dependent activation of MAP kinase: A link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell* 1995;6:273-282.
 26. Leung WK, Wu Q, Hannam PM, McBride BC, Uitto VJ. *Treponema denticola* may stimulate both epithelial proliferation and apoptosis through MAP kinase signal pathways. *J Periodontal Res* 2002;37:445-455.
 27. Takeuchi Y, Suzawa M, Kikuchi T, et al. Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2 beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1997 Nov 14; 272:29309-29316.
 28. Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, et al. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 2002 Jan;17:101-110.
 29. Kaori M., Motohiro K., Kenko I., Isao I. Extracellular signaling-regulated kinase1/2 is involved in ascorbic acid-induced osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2007;78:328-334.
 30. Kim TI, Jang JH, Lee YM, et al. Design and biological activity of synthetic oligopeptides with Pro-his-Ser-Arg-Asn (PHSRN) and Arg-Gly-Asp(RGD) motifs of human osteoblast-like cell(MG-63) adhesion. *Biotechnology letters* 2002;24:2029-2033

