

Effect of Resveratrol on Cell Differentiation and Mineralization in Cultured Odontoblasts

Sang Hun Shin¹, Jae-Sung Kim¹, Su-Gwan Kim¹, Dae-San Go¹, Sun-Kyoung Yu¹, Chun Sung Kim¹, Joo-Cheol Park² and Do Kyung Kim^{1*}

¹Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

²Department of Oral Histology-Developmental Biology and Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University, 101 Daehagro, Chongro-gu, Seoul 03080, Republic of Korea

(received July 21, 2018; revised August 7, 2018; accepted August 9, 2018)

Resveratrol (3,4',5,-trihydroxystilbene), a phytoalexin present in grapes, exerts a variety of actions to reduce superoxides, prevents diabetes mellitus, and inhibits inflammation. Resveratrol acts as a chemo-preventive agent and induces apoptotic cell death in various cancer cells. However, the role of resveratrol in odontoblastic cell differentiation is unclear. In this study, the effect of resveratrol on regulating odontoblast differentiation was examined in MDPC-23 mouse odontoblastic cells derived from mouse dental papilla cells. Resveratrol significantly accelerated mineralization as compared with the control culture in differentiation of MDPC-23 cells. Resveratrol significantly increased expression of ALP mRNA as compared with the control in differentiation of MDPC-23 cells. Resveratrol significantly accelerated expression of Col I mRNA as compared with the control in differentiation of MDPC-23 cells. Resveratrol significantly increased expressions of DSPP and DMP-1 mRNAs as compared with the control in

differentiation of MDPC-23 cells. Treatment of resveratrol did not significantly affect cell proliferation in MDPC-23 cells. Results suggest resveratrol facilitates odontoblast differentiation and mineralization in differentiation of MDPC-23 cells, and may have potential properties for development and clinical application of dentin regeneration materials.

Key words: resveratrol, odontoblasts, differentiation, mineralization

서론

치아의 형성은 치성상피와 외배엽성 간엽세포 사이의 상피-간엽 상호작용을 통해 조절되어지는 정밀한 발생과정을 통해 이루어진다[1]. 치성상피는 치아기(dental organ)를 형성하여 법랑질모세포를 분화시키며, 외배엽성 간엽세포는 치유두(dental papilla)를 형성하여 상아질모세포와 치수세포가 분화하고 이들이 치관 상아질과 치수를 형성한다[1-3]. 치관이 완성된 후에 내치상피와 외치상피가 치관 아래쪽으로 증식하여 Hertwig 상피 근초를 형성하며, Hertwig 상피 근초가 치근의 형태를 결정하고 치근 상아질을 형성하는 상아질모세포의 분화를 유도한다[1-3]. 상아질은 치아의 가장 중요한 구성 성분으로 치관과 치근의 대부분을 구성한다[3-5]. 상아질모세포의 분화과정은 다양한 세포기질 분자, 신호전달물질, 성장인자, 이온 및 여러 수용체들이 관여하는 고도로 조직화되고 복잡한 과

*Correspondence to: Do Kyung Kim, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 61452, Republic of Korea
Tel: +82-62-230-6893, Fax: +82-62-232-6896
E-mail: kdk@chosun.ac.kr
ORCID : 0000-0001-6254-946X

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

정이다[6-8]. 상아질모세포의 분화에 관련된 인자들로는 transforming growth factor- β 나 dentin matrix protein-1 (DMP-1) 등이 현재까지 알려져 있으나, 이들은 다양한 경조직의 형성에 전반적으로 관여하는 인자들로서 상아질모세포의 분화에 선택적으로 관여하는 인자는 아닌 것으로 밝혀지고 있다[9-11]. 또한, 최근에 DSPP 유전자가 소실되면 상아질의 석회화 과정에서 석회소구의 융합이 이루어지지 않거나 치수실이 커지고 꺾상아질의 두께가 넓어지며 석회화 저하 및 치수노출이 일어날 수 있다고 하였으나, 이 과정에서도 상아질모세포의 분화와 성숙과정은 정상적으로 진행된다고 하여, dentin sialophosphoprotein (DSPP) 이외에도 상아질모세포의 분화를 조절하는 인자가 더 많이 존재할 것으로 예상되고 있다[12]. 이와 같은 많은 연구에도 불구하고 상아질모세포의 분화과정이나 상아질의 형성과정과 관련된 분자생물학적 기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 최근 상아질 재생에 대한 관심이 높아지면서 이와 관련한 연구가 활발히 진행되고 있으나 상아질의 특수성과 여러 가지 실험적 제한으로 인하여 연구결과는 매우 미미하다[13]. 이러한 많은 문제점들을 해결하기 위해서 분자생물학, 생물공학 및 조직공학을 이용한 상아질 재생 유도물질의 개발이 향후 상아질 재생연구의 중점이 될 것으로 사료되며[13], 이를 위해서는 특히 상아질모세포의 분화기전을 명확히 이해하는 것이 필수요소라 생각된다.

생약(crude drugs)이란 천연산출 자연물을 그대로 또는 간단히 가공처리 하여 의약품으로 사용하거나 의약품의 원료로 삼는 약을 말한다[14]. 유효 성분의 종류와 함량이 일정하지 않고 그 효과도 일정하지 않다는 생약의 단점에도 불구하고, 최근 들어 이러한 생약들로부터 다양한 질병치료를 위한 새로운 유효 성분과 치료 의약품을 개발하기 위한 노력이 세계적으로 활발하게 진행되고 있다[14-15]. 포도, 땅콩이나 오디에 다량 함유되어 있는 resveratrol (3,4',5,-trihydroxystilbene)은 파이토알렉신(외독소에 대해 식물조직이 산출하는 항독성 물질)으로서 폴리페놀계 물질이다[16-17]. Resveratrol은 당뇨예방, 염증억제, 신경퇴행성 질환의 예방 및 항산화 효과 등의 기능을 보유하고 보고되어져 왔으며[18-20], 최근 들어 resveratrol에 의한 여러 종류의 암세포 성장 억제효과도 보고되었다[21-24]. 그러나 상아질모세포의 분화과정이나 상아질의 형성과정에서 resveratrol의 효과에 관한 자료는 거의 없다.

최근 들어 상아질모세포 연구에 널리 이용되고 있는 MDPC-23 세포주는 CD-1 생쥐 어금니의 치유두를 이용하여 만든 세포주로서, 일정조건에서 배양하면 상아질모세포의 특성을 나타낸다는 것을 확인한 세포주이다[25-27]. 본 연구에서는 상아질모세포로서 MDPC-23 세포주의 분

화과정에서 resveratrol의 효과를 분석하여, 상아질 재생 유도물질 개발의 토대를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Resveratrol (trans-3,4',5,-trihydroxystilbene, Fig. 1), Alizarin red S 및 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corp.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다. 본 연구를 위한 예비실험에서, resveratrol의 MDPC-23 세포주 분화에 미치는 효과를 조사한 결과, resveratrol 100 μ M 처리군에서부터 대조군과 차이를 보이기 시작하였다. 따라서 본 연구에서는 resveratrol의 효과가 나타나기 시작한 농도인 100 μ M을 이용하여 MDPC-23 세포주 분화에 미치는 여러 가지 효과를 조사하였다.

2. 세포주와 세포배양

본 연구에서는 상아질모세포로서 생쥐 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주를 J. E. Nör 박사(University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA)로부터 제공받아 실험에 이용하였다. MDPC-23 세포주를 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제(penicillin 100IU/ml, streptomycin 100 μ g/ml, gentamycin 50 μ g/ml, fungizone 2.5 μ g/ml)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)에 배양하였으며, 세포분화와 석회화 유도를 위하여, 동일배지에 ascorbic acid(50 μ l/ml)와 β -glycerophosphate (10mM)를 첨가하여 7일까지 배양하면서 실험에 이용하였다[25-28].

3. Alizarin red-S 염색을 통한 골기질 형성 분석

MDPC-23 세포주의 석회화 결절을 확인하기 위하여 Alizarin red-S 염색을 시행하였다. 분화를 유도하고 resveratrol을 처리한 각 실험군의 MDPC-23 세포주를 PBS로 3회 세척한 후, 70% ethyl alcohol로 20분 동안 고정한 다음 0.1% NH₄OH가 함유된 1% Alizarin red-S(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 5분간 염색하여 관찰하였다.

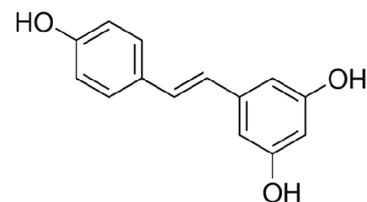


Fig. 1. Chemical structure of resveratrol.

골기질 형성정도를 정량하기 위해, 색도분광법을 이용하여 결절의 정도를 측정하였다. 염색한 세포를 4°C에서 1,500xg로 10분간 원심분리한 후, 수집한 세포를 상온의 5% SDS와 0.5N HCl에서 30분간 용해시켜 405nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

4. 역전사 증합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석

세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 MDPC-23 세포주에서 TRIzol Reagent Kit(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrometer)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정, 추출된 RNA의 농도를 계산하였다. 역전사 반응을 위하여 1 μ g의 total RNA와 ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하였다. 합성된 cDNA를 alkaline phosphatase(ALP; ALP-F, 5'-CTCTCCGAGATGGTGGAGGT-3'; ALP-R, 5'-GTCTTCTCCACCGTGGGCT-3'), type I collagen(Col I; Col I-F, 5'-TAAGTTGCCAAGAACGTGCC-3'; Col I-R, 5'-AATTGAAAGCCAGGAGGCAT-3'), dentin sialophosphoprotein(DSPP; DSPP-F, 5'-ATAGCACC AACCATGAGGCT-3'; DSPP-R, 5'-CTTTTGTGCTTTGTTGGG-3'), dentin matrix protein-1(DMP-1; DMP-1-F, 5'-CGGCTGGTGGTCTCTCTAAG-3'; DMP-1-R, 5'-ATCTTCCTGGGACTGGGICT-3'), bone sialoprotein(BSP; BSP-F, 5'-AAGAAAA TGGAGACGCGCAT-3'; BSP-R, 5'-CACCTGCTTCAGTGACGCTT-3') 및 GAPDH(GAPDH-F, 5'-TGCATCCTGCACCA CCAACT-3'; GAPDH-R, 5'-CGCCTGCTTACCACCTTC-3') 등의 primer를 이용하여 증합효소연쇄반응을 시행하였다. RT-PCR 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 각각의 PCR product를 확인하였으며, 각 실험군 사이의 발현차이는 VersaDoc™ Imaging System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

5. MTT 분석에 의한 세포증식 측정

Resveratrol에 의한 세포증식 효과를 관찰하기 위해, 24well plate에 5 X 10³cells/well의 MDPC-23 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, resveratrol을 다양한 농도와 시간에서 처리하여 37°C에서 반응시킨 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT 분석은 resveratrol을 처리한 MDPC-23 세포에 MTT 용액(MTT 최종농도 0.5 μ g/ μ l)을 37°C에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

6. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean \pm SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를

하였으며, p value가 0.05 미만(p<0.05)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 또한 본 연구의 통계적 검정은 SPSS ver. 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. MDPC-23 상아질모세포 분화과정에서 세포의 기질형성에 미치는 resveratrol의 효과

MDPC-23 상아질모세포 분화과정에서 세포의 기질형성에 미치는 resveratrol의 효과를 확인하기 위하여, MDPC-23

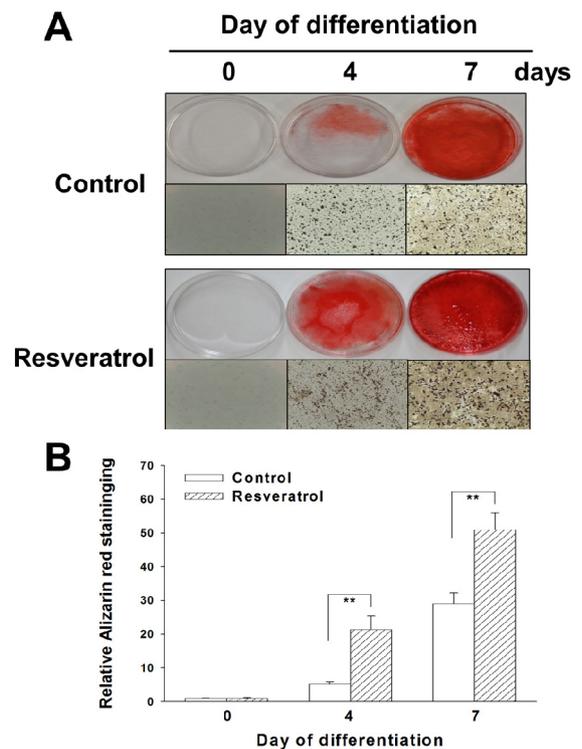


Fig. 2. Effect of resveratrol on the mineralization in MDPC-23 odontoblastic cells. Confluent cultures of MDPC-23 cells were maintained in complete medium with the addition of differentiation cocktail (50 μ g/ml ascorbic acid and 10 mM β -glycerophosphate). MDPC-23 odontoblastic cell mineralization was altered by resveratrol. (A) Mineralized nodule formation in MDPC-23 cells. MDPC-23 cells were treated with 100 μ M resveratrol for 7 days, and the mineralization was evaluated by Alizarine red S staining (0; 0 day after treatment with differentiation media, 4; 4 days after treatment with differentiation media, 7; 7 days after treatment with differentiation media, Control; treatment with differentiation media only, resveratrol; treatment with differentiation media and 100 μ M resveratrol). (B) Quantification of mineralization was accessed by colorimetric spectrophotometry. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. ** p <0.01 vs. control (the control cells were measured in the absence of resveratrol treatment).

세포주 분화과정에서 resveratrol 100 μ M을 처리한 후 Alizarine red-S 염색을 시행하였으며, 분화유도를 위하여 ascorbic acid(50 μ l/ml)와 β -glycerophosphate(10mM)를 첨가하였다. 분화유도 4일째에서부터 대조군과 resveratrol 처리군에서 세포외 기질형성 정도가 증가하는 경향을 보였으며, 분화유도 4일과 7일째 대조군에 비해 resveratrol 처리군에서 세포외 기질형성의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 세포외 Alizarine red-S 염색 정도를 정량하여 세포외 기질형성의 증가를 확인한 실험에서도 분화유도 4일과 7일에서 대조군에 비해 resveratrol 처리군에서 세포외 기질형성의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

2. MDPC-23 상아질모세포 분화과정에서 분화 특이 유전자들의 발현에 미치는 resveratrol의 효과

생쥐 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주에 ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 첨가하여 석회화 결절의 형성을 유도한

배양과정에서 resveratrol의 효과를 분석하기 위해, MDPC-23 세포주 분화과정에서 resveratrol 100 μ M을 처리한 후 ALP, Col I, DSPP, DMP-1 및 BSP 각각의 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다.

ALP mRNA의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 점차 증가하였다(Fig. 3). 대조군에서는 분화 4일째까지 ALP의 발현을 거의 관찰할 수 없었으나, 7일째에는 ALP mRNA의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). Resveratrol 처리군에서는 분화 4일째에 대조군에서보다 1.34배의 ALP mRNA 발현을 보였고, 7일째에서는 대조군에서보다 1.57배의 ALP mRNA 발현을 관찰할 수 있었으며, 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 resveratrol은 ALP mRNA의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 3). Col I mRNA의 발현도 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 점차 증가하였다(Fig. 4). 대조군에서는 분화 4일째까지 Col I의 발현이 매우 미약하였으나, 7일째에는 Col I mRNA의 발현은 뚜렷이 나타났다(Fig. 4). Resveratrol 처리군에서는 분화 4일째에 대조군에서보다 1.61배의 Col I mRNA 발현을 보였고, 7일째에서는 대조군에서보다 1.76배의 Col I mRNA 발현을 관찰할

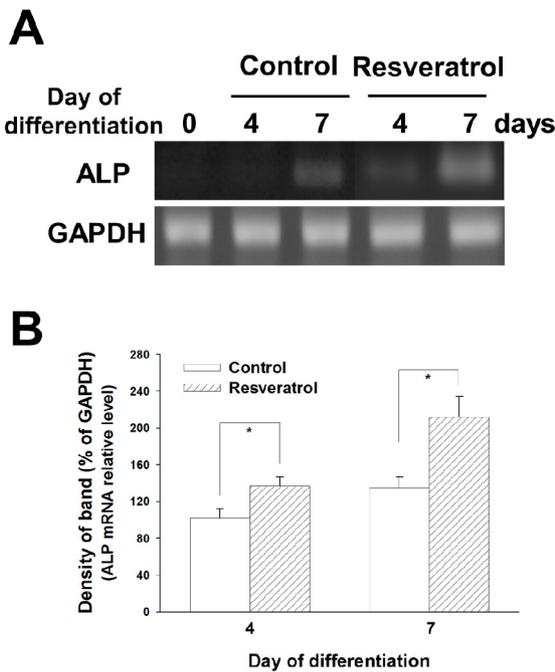


Fig. 3. Effect of resveratrol on alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression. Total RNA was isolated using TRIzol reagent and reverse transcription was carried out with 1 μ g of total RNA using the ThermoScript RT-PCR system. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide. (A) Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells. (B) The quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after GAPDH normalization. The percentage of ALP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. * p <0.05 vs. control (the control cells were measured in the absence of resveratrol treatment).

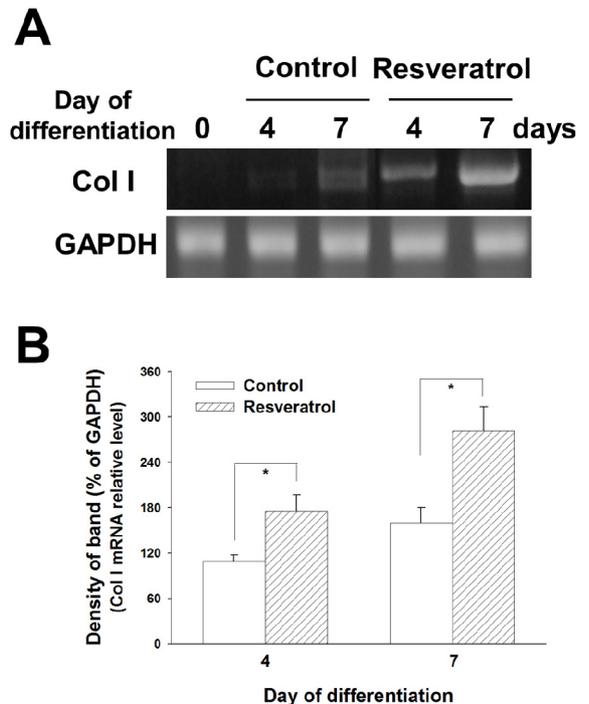


Fig. 4. Effect of resveratrol on type I collagen (Col I) mRNA expression. (A) Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells. (B) The percentage of Col I mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. * p <0.05 vs. control (the control cells were measured in the absence of resveratrol treatment).

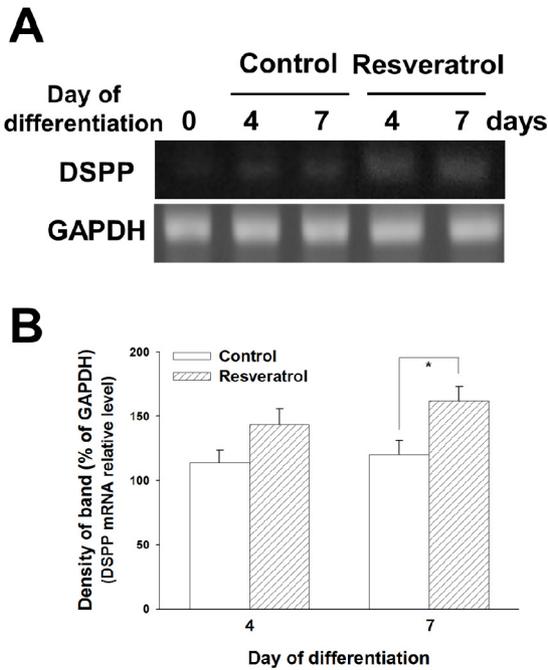


Fig. 5. Effect of resveratrol on dentin sialophosphoprotein (DSPP) mRNA expression. (A) Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells. (B) The percentage of DSPP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. * $p < 0.05$ vs. control (the control cells were measured in the absence of resveratrol treatment).

수 있었으며, 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화 유도 과정에서 resveratrol은 Col I mRNA의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 4). 상아질모세포 분화 특이유전자인 DSPP mRNA의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 점차 증가하였다(Fig. 5). 대조군에서 분화 4일째부터 DSPP의 발현이 뚜렷이 나타났으며, resveratrol 처리군에서는 분화 4일째에 대조군에서보다 1.26배의 DSPP mRNA 발현을 보였고, 7일째에서는 대조군에서보다 1.35배의 DSPP mRNA 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 resveratrol은 DSPP mRNA의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 5). 본 연구에서 MDPC-23 세포주에서 분화를 유도한 후 시간이 경과함에 따라 DMP-1 mRNA의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 대조군에서 분화 4일째부터 DMP-1의 발현이 뚜렷이 나타났으며, resveratrol 처리군에서는 분화 4일째에 대조군에서보다 1.21배의 DMP-1 mRNA 발현을 보였고, 7일째에서는 대조군에서보다 1.24배의 DMP-1 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 본 연구의 결과로 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 resveratrol은 DMP-1 mRNA의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 6). 본 연구에서 뼈모세포 분화 특이유전자

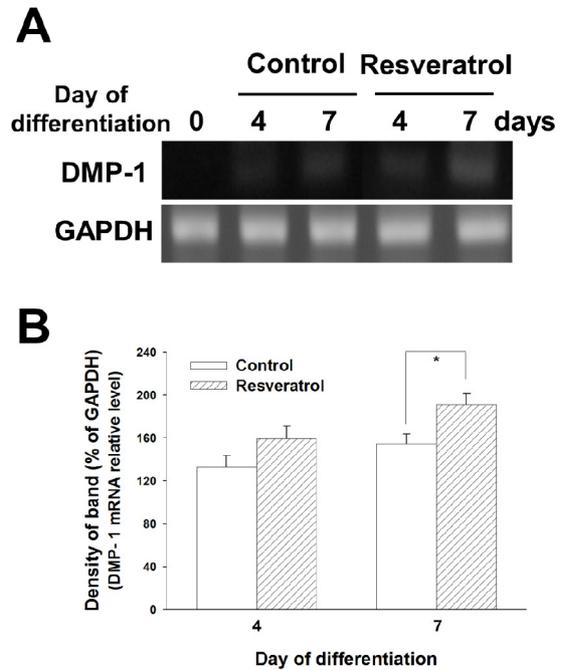


Fig. 6. Effect of resveratrol on dentin matrix protein-1 (DMP-1) mRNA expression. (A) Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells. (B) The percentage of DMP-1 mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. * $p < 0.05$ vs. control (the control cells were measured in the absence of resveratrol treatment).

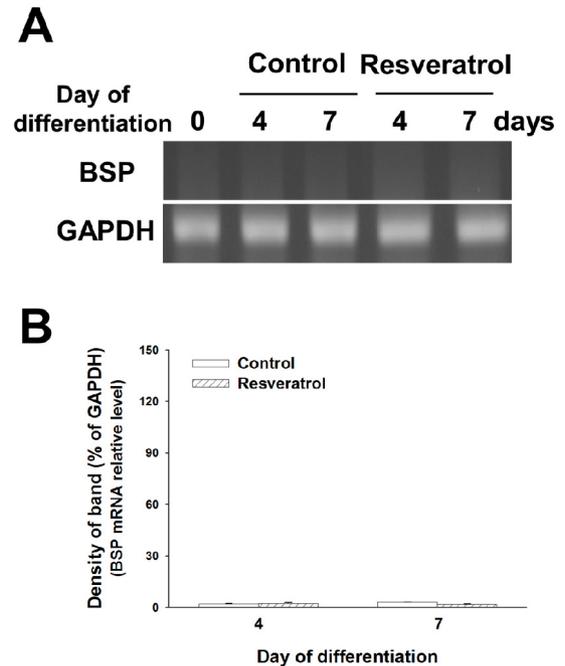


Fig. 7. Effect of resveratrol on bone sialoprotein (BSP) mRNA expression. (A) Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MDPC-23 cells. (B) The percentage of BSP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments.

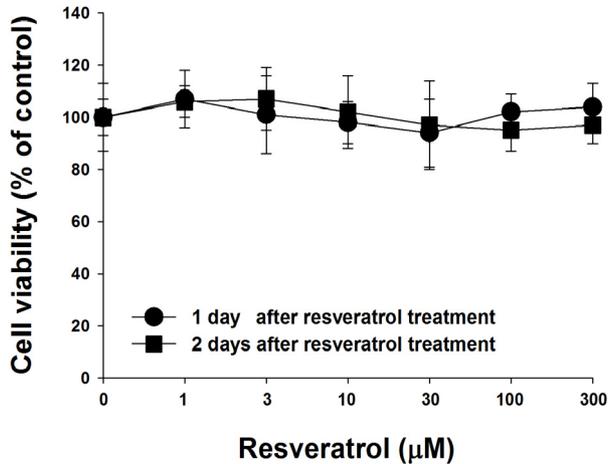


Fig. 8. Measurement of MDPC cell proliferation by resveratrol. The cells were treated with resveratrol at various defined concentrations (1, 3, 10, 30, 100 and 300 μM) for 1 and 2 days at 37°C. The cell proliferation was determined by MTT assays after resveratrol treatment. The experiments were repeated four times, independently.

인 BSP mRNA의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

3. MDPC-23 상아질모세포 증식에 미치는 resveratrol의 효과

MDPC-23 상아질모세포 증식에 미치는 resveratrol의 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. Resveratrol 1~300 μM 을 1일과 2일 처리한 결과, resveratrol은 MDPC-23 상아질모세포의 증식에는 전혀 영향을 주지 않았다(Fig. 8).

고 찰

상아질은 치아의 중요한 구성 성분으로 치관과 치근의 대부분을 구성하며, 상아질모세포는 제 I 형과 II 형 교원질과 같은 유기기질과 당단백 및 DSPP를 합성하고 분비한다[29-30]. 상아질의 기질이 침착됨에 따라 상아질모세포가 세포질 돌기들을 원심 쪽으로 내어 상아세관에 묻히게 되고, 결과적으로 상아질모세포는 치수 가장자리 상아질의 내면에 위치하여 상아질을 유지한다[29-30]. 그러나 상아질모세포의 분화기전과 상아질의 형성과정을 조절하는 인자 그리고 그와 관련된 분자생물학적 기전은 아직까지 명확히 알려져 있지 않다. 최근, 생약을 이용하여 항암제를 포함한 다양한 의약품을 개발하기 위한 노력이 세계적으로 다양한 산업 분야에서 커지고 있다[14-15]. 최근 들어 포도에 많이 함유되어 있는 파이토알렉신 중 하나인 resveratrol의 당뇨예방, 염증억제, 신경퇴행성 질환의 예방, 항산화 효과 및 특정

암세포 성장억제 효과 등의 기능이 보고되었다[16-24]. 그러나 치아형성 과정에서 resveratrol의 생물학적 기능은 거의 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 상아질모세포의 분화과정에서 resveratrol의 효과를 밝히기 위해, 생쥐 치유두 세포 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주에서 분화유도와 resveratrol을 처리한 후, MDPC-23 세포주의 특성변화를 분석하였다.

본 연구에서 분화 중인 MDPC-23 세포주의 형태학적인 관찰과 세포외 기질형성을 육안으로 확인하기 위해 Alizarine red-S 염색을 시행하였다. 분화유도 4일째에서부터 대조군과 resveratrol 처리군에서 세포외 기질형성 정도가 증가하는 경향을 보였으며, 분화유도 4일과 7일째 대조군에 비해 resveratrol 처리군에서 세포외 기질형성의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 본 연구의 결과는 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 resveratrol이 상아질모세포 MDPC-23의 분화를 직접적으로 촉진시킬 수 있음을 시사하고 있다.

본 연구에서 상아질모세포 MDPC-23 세포주의 분화를 유도한 후 경조직 분화 특이유전자인 ALP와 Col I mRNA의 발현[1,5]은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정 초기에는 관찰할 수 없었으나 배양시간이 경과하면서 점차 증가하였다(Fig. 3, 4). ALP mRNA의 발현은 resveratrol 처리군에서 분화 4일째에 대조군에서보다 1.34배의 발현을 보였고, 7일째에서는 대조군에서보다 1.57배의 ALP mRNA 발현을 관찰할 수 있었으며, Col I mRNA의 발현은 resveratrol 처리군에서 분화 4일째에 대조군에서보다 1.61배의 발현을 보였고, 7일째에서는 대조군에서보다 1.76배의 Col I mRNA 발현을 관찰할 수 있었다. 본 연구의 결과로 상아질모세포 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 resveratrol은 ALP와 Col I의 발현을 증가시킬 수 있었으며, 이는 resveratrol이 상아질모세포의 분화를 촉진시킬 수 있음을 시사한다.

상아질모세포 MDPC-23 세포주의 분화과정에서 상아질모세포 분화 특이유전자인 DSPP와 DMP-1 mRNA의 발현[1,5]은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 점차 증가하였다(Fig. 5, 6). DSPP mRNA의 발현은 resveratrol 처리군에서 분화 4일째에 대조군에서보다 1.26배의 발현을 보였고, 7일째에서는 대조군에서보다 1.35배의 DSPP mRNA 발현을 관찰할 수 있었으며, DMP-1 mRNA의 발현은 resveratrol 처리군에서 분화 4일째에 대조군에서보다 1.21배의 발현을 보였고, 7일째에서는 대조군에서보다 1.24배의 DMP-1 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다. 본 연구의 결과로 상아질모세포 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 resveratrol은 DSPP와 DMP-1의 발현을 증가시킬 수 있었으며, 이는 resveratrol이 상아질모세포의 분화를 촉진시킬 수 있음을 시

사한다. 그러나 본 연구에서 뼈모세포 분화 특이유전자인 BSP mRNA의 발현은 MDPC-23 세포주의 분화유도 과정에서 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

한편, 상아질모세포 MDPC-23 세포주에서 resveratrol의 생존 및 증식에 미치는 효과를 알아보기 위한 MTT 분석 결과, 본 연구에서 시험한 농도(1~300 μ M)의 resveratrol은 MDPC-23 세포주의 증식에 영향을 주지 않았다(Fig. 8). 성장호르몬, insulin like growth factor-I 또는 transforming growth factor- β 등은 경조직의 성장을 촉진하는 성장인자로 알려져 있으며[31,32], fibroblast growth factor 같은 성장인자들은 경조직 미세환경에서 조상세포들(progenitors)의 증식을 촉진하는 국소기전을 제공한다 알려져 있다 [31-33]. 본 연구에서 resveratrol은 상아질모세포 MDPC-23 세포주의 증식에 영향을 주지 않았으며, 이 결과는 resveratrol이 상아질모세포 성장과 증식에는 영향을 주지 않으면서, 분화유도 과정에서 상아질모세포의 분화를 직접적으로 촉진시킬 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 치아형성 과정에서 상아질모세포 분화의 분자적인 기전과 resveratrol의 효과에 대한 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하고야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, 본 연구의 결과로 생쥐 치유두세포 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주 분화과정에서 resveratrol이 상아질모세포 분화를 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 본 실험의 결과로, 상아질 수복과 재생에 관한 하나의 연구방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2018학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음(This study was supported by research fund from Chosun University, 2018).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

1. Lee DS, Yoon WJ, Cho ES, Kim HJ, Gronostajski RM, Cho MI, Park JC. Crosstalk between nuclear factor I-C and transforming growth factor- β 1 signaling regulates odontoblast differentiation and homeostasis. *PLoS One*. 2011;6:e29160. doi: 10.1371/journal.pone.0029160.

2. Mina MI, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol*. 1987;32:123-127.
3. Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol*. 1998;76:923-938.
4. Sun Q, Liu H, Lin H, Yuan G, Zhang L, Chen Z. MicroRNA-338-3p promotes differentiation of mDPC6T into odontoblast-like cells by targeting Runx2. *Mol Cell Biochem*. 2013;377:143-149. doi: 10.1007/s11010-013-1580-3.
5. Cho JH, Kim SG, Park BS, Go DS, Park JC, Kim DK. MicroRNA-27 promotes odontoblast differentiation via Wnt1 signaling. *Int J Oral Biol*. 2015;40:197-204. doi: http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2015.40.4.197.
6. Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *J Dent Res*. 1990;69:75-81. doi: 10.1177/00220345900690011301.
7. Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH. Six decades of dentinogenesis research. Historical and prospective views on phosphophoryn and dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(Suppl 1):211-220.
8. Telles PD, Hanks CT, Machado MA, Nor JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res*. 2003;82:466-470. doi: 10.1177/154405910308200612.
9. Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF-beta in induction of reparative dentinogenesis *in vivo*. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(Suppl 1):192-196.
10. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:13625-13630. doi: 10.1073/pnas.240309797.
11. Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:4516-4521. doi: 10.1073/pnas.081075198.
12. Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem*. 2003;278:24874-24880. doi: 10.1074/jbc.M303908200.
13. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production *in vitro*. *Exp Cell Res*. 2000;258:33-41. doi: 10.1006/excr.2000.4909.
14. Choi EJ, Jang SR, Kang OJ, Bang WS. Antimicrobial activity of *Psoralea corylifolia*, *Schisandra chinensis*, and *Spatholobus suberectus* extracts. *Kor J Food Sci Technol*. 2013;45:495-500. doi: 10.9721/KJFST.2013.45.4.495.
15. Shin JH, Cha GY, Kim HJ, JH Hwang, Han KH, Seo1 HJ, Shin TS, Oh SJ, Kim JD. Examination of anti-obesity effect of regional special natural products of *Anthriscus radix*, *Psoraleae semen*, *Siegesbeckiae herba* and *Corni fructus*.

- KSBB J. 2009;24:549-555.
16. Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, Tarver C. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer*. 2010;10:238-251. doi: 10.1186/1471-2407-10-238.
 17. Wang TT, Hudson TS, Wang TC, Remsberg CM, Davies NM, Takahashi Y, Kim YS, Seifried H, Vinyard BT, Perkins SN, Hursting SD. Differential effects of resveratrol on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis*. 2010;29:2001-2010. doi: 10.1002/mnfr.200900143.
 18. Elliott PJ, Jirousek M. Sirtuins: novel targets for metabolic disease. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008;9:371-378.
 19. Jiang H, Shang X, Wu H, Gautam SC, Al-Holou S, Li C, Kuo J, Zhang L, Chopp M. Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J Exp Ther Oncol*. 2009;8:25-33.
 20. Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2009;54:111-118. doi: 10.1016/j.neuint.2008.10.008.
 21. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275:218-220.
 22. Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloproteinase 9. *Cancer Res*. 2002;62:4945-4954.
 23. Stewart JR, Artime MC, O'Brian CA. Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J Nutr*. 2003;133:2440-2443. doi: 10.1093/jn/133.7.2440S.
 24. Hope C, Planutis K, Planutiene M, Moyer MP, Johal KS, Woo J, Santoso C, Hanson JA, Holcombe RF. Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(Suppl 1):52-61. doi: 10.1002/mnfr.200700448.
 25. Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(Suppl 1):260-266.
 26. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res*. 1998;37:233-249.
 27. Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Bègue-Kirn C, Wataha JC, Hanks CT, Butler WT. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res*. 1998;37:251-261.
 28. Kim DK, Park MG, Lee MH, Yu SK, Park E, Kim S, Lee SA, Moon YH, Kim HJ, Kim CS. MicroRNA analysis during cultured odontoblast differentiation. *Int J Oral Biol*. 2012;37:146-152.
 29. Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol*. 2004;31:184-192. doi: 10.1111/j.0303-6979.2004.00473.x.
 30. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and *in vitro*-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1994;38:405-420.
 31. Verhaar HJ, Damen CA, Duursma SA, Scheven BA. A comparison of the action of progestins and estrogen on the growth and differentiation of normal adult human osteoblast-like cells *in vitro*. *Bone*. 1994;15:307-311.
 32. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells *in vitro*. *Growth Regul*. 1994;4:131-135.
 33. Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry*. 2001;56:733-739.