

Mineral trioxide aggregate가 인간치수세포에서 유전자 발현에 미치는 영향

김용범 · 손원준 · 이우철 · 금기연 · 백승호 · 배광식*

서울대학교 치의학대학원 치과보존학교실, 치의학연구소, BK21 Program

ABSTRACT

GENE EXPRESSION PROFILING IN HUMAN DENTAL PULP CELLS TREATED WITH MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE

Yong-Beom Kim, Won-Jun Shon, WooCheol Lee, Kee-Yeon Kum, Seung-Ho Baek, Kwang-Shik Bae*

Department of Conservative Dentistry, Dental Research Institute, BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

This study investigated the changes in gene expression when mineral trioxide aggregate (MTA) was applied *in vitro* to human dental pulp cells (HDPCs). MTA in a teflon tube (diameter 10 mm, height 2 mm) was applied to HDPCs. Empty tube-applied HDPCs were used as negative control. For microarray analysis, total RNA was extracted at 6, 24, and 72 hrs after MTA application. The results were confirmed selectively by performing reverse transcriptase polymerase chain reaction for genes that showed changes of more than two-fold or less than half. Of the 24,546 genes, 109 genes were up-regulated greater than two-fold (e.g., FOSB, THBS1, BHLHB2, EDN1, IL11, FN1, COL10A1, and TUFT1) and 69 genes were down-regulated below 50% (e.g., SMAD6 and DCN). These results suggest that MTA, rather than being a bio-inert material, may have potential to affect the proliferation and differentiation of pulp cells in various ways. [J Kor Acad Cons Dent 35(3):152-163, 2010]

Key words: Microarray, Mineral trioxide aggregate, Dental pulp capping, Human dental pulp cell, Differentiation, Proliferation

-Received 2010.3.20., revised 2010.4.6., accepted 2010.4.12.-

I. 서 론

직접치수복조(direct pulp capping)는 생활치수가 노출된 경우 치수 조직에 외부자극을 차단하고 수복상아질(reparative dentin)의 형성을 촉진하여 치수의 생활력을 유지하기 위해 시행된다.¹⁾ 수산화칼슘이 직접치수복조술에 수십 년 동안 가장 널리 사용되어왔음에도 불구하고 형성된 수복상아질이 균일하지 않으며 내부에 tunnel 구조를 가지

며 남은 치수내의 과도한 석회화가 일어나는 등의 단점이 보고되고 있다.²⁻⁴⁾

비교적 최근에 소개된 재료인 mineral trioxide aggregate (MTA)는 perforation repair나 치근단 역충전에 주로 사용되었으며 여러 연구에서 생체친화성이 좋은 것으로 보고되었다.^{5,6)} 이 후 MTA를 이용한 치수복조술을 사용한 경우에서도 우수한 결과가 보고되었다. 원숭이와 개의 치아에 MTA와 수산화칼슘을 이용한 치수복조술을 시행한 경우 MTA가 수산화칼슘과 비교하여 유사하거나 더 좋은 결과를 보여 주었다.⁷⁻¹⁰⁾

이런 연구들이 조직학적 소견에 의해 MTA를 치수복조제 재료써 평가했던 것과 달리 최근에는 mineralized matrix marker의 유전자 발현을 관찰하는 연구들이 보고되고 있다.¹¹⁻¹³⁾

*Corresponding Author: Kwang-Shik Bae
Department of Conservative Dentistry,
School of Dentistry, Seoul National University
275-1 Yeongeong-Dong, Jongno-Gu, Seoul, 110-768, Korea
Tel: 82-2-2072-2651 Fax: 82-2-2072-3859
E-mail: baeks@snu.ac.kr

치수복조용 제재에 대한 치수조직의 반응에 대해서 많은 연구가 진행되어 왔지만 치수복조용 제재의 상아질 형성 능력이 치수복조 제재에 의해 유도되는 고유한 능력인지 외상을 입은 치수자체의 치유과정인지도 아직 확실히 규명되지 못했다.

Microarray를 이용한 실험방법은 다양한 재료에 대해 수만 개의 유전자 발현을 동시에 분석할 수 있는 방법이다. 이는 세포의 발생, 세포내의 신호 전달, apoptosis, 질병의 진단, 치료효과, 약물 개발, 그리고 약물안전평가에 사용될 수 있다.¹⁴⁾

최근 인간 치수의 줄기세포(human dental pulp stem cell)와 골수 기질의 줄기세포(bone marrow stromal stem cell)의 유전자 차이를 분석한 연구, 우식증이 있는 치아와 없는 치아의 치수조직에서의 유전자 차이를 분석한 연구, 레진계열 봉합제가 조골세포에 미치는 영향을 분석한 연구 그리고 치수세포와 치주인대세포의 유전자차이를 비교한 연구에서 microarray가 사용되었다.¹⁵⁻¹⁸⁾ 이런 치수조직과 치주조직에서 시도된 다양한 microarray 연구들이 보고되었지만, 현재까지 MTA로 치수복조술을 시행하였을 때 치수세포에서 일어나는 유전자 발현양상에 대해서 조사한 연구는 없었다.

이번 연구의 목적은 MTA를 치수세포에 적용하였을 때 변화하는 치수세포의 유전자들 중에서 치수세포의 분화와 증식에 관여하는 유전자가 어떤 변화를 보이는지 분석하기 위함이다. 본 연구는 MTA를 일차세포 배양한 인간치수세포에 적용하고 시간대별로(6, 24, 72시간) 표본을 채취하여 처리한 후 microarray를 이용하여 유전자 변화를 분석하고 선택적으로 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR))을 이용하여 이를 확인하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 인간 치수세포의 일차세포배양

인간 치수세포의 일차세포배양은 다음과 같은 방법을 사용하였다.¹⁹⁾ 서울대학교치과병원 구강악안면외과에서 2009년 10월 내원한 성인의 건전한 제3대구치를 환자의 동의 하에 발치하였으며 모든 실험과정은 서울대학교치과병원 연구윤리심의위원회의 승인 하에 진행하였다(CRI09020). 발치 즉시 항생제가 들어있는 phosphate-buffered saline에 넣은 상태로 실험실로 이동하여 #330 bur를 사용하여 백악법랑질 경계 하방 1 mm에서 수평으로 치아를 절단하였다.

이후 치수조직을 조심스럽게 꺼내어 blade로 작게 썰어서 4 mg/ml dispase II (Roche, San Francisco, CA, USA)

와 3 mg/ml collagenase (Sigma, St Louis, MO, USA)가 1:1로 혼합된 용액에 넣고 37℃에서 10분간 반응시킨 후, 떨어져 나온 조직 덩어리와 세포들을 모아서 원심 분리한 뒤 침전물(pellet)을 얻었다. 이들을 10% fetal bovine serum (Sigma)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지에 재 부유시켜 배양시킨 지 4일 후에 6 well culture plate (SPL life science, Pocheon, Gyeonggi, Korea)에 자라난 세포들이 확인되었다. 세포 수와 생존도는 trypan blue 염색을 통해 확인하였고, 5-7번째 계대의 세포들을 본 실험에 사용하였다. Hemocytometry를 이용하여 치수세포를 10% fetal bovine serum (Sigma), 100 U/mL penicillin과 100 μ m/mL streptomycin의 항생제가 포함된 DMEM에 1×10^5 /well의 농도로 적용한 후 37℃, 5% CO₂, 95% air상태에서 배양하였다. Well에 세포를 적용한 후 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 시편 제작

내경 10 mm의 테플론 튜브를 2 mm의 두께로 절단하여 ethylene oxide gas 소독을 시행하였다. 이 후 white MTA (ProRoot; Dentsply, Tulsa, OK, USA)를 제조사의 지시대로 혼합하여 준비된 테플론 튜브에 삽입하였다. 혼합 4시간 후 시편을 0.4 μ m의 pore size를 가지는 permeable transwell insertion (Millipore, Billerica, MA, USA)위에 올려서 치수세포에 직접 접촉이 되지 않게 6 well culture plate (SPL life science)에 넣었다. 각 well에 3 mL의 배양액을 담가 주었으며 빈 튜브를 넣은 well을 대조군으로 사용하였다. 시편의 적용 후 6, 24, 72시간에 같은 군(n=3)의 세포를 pooling하였다.

3. Microarray analysis

Pooling한 세포에서 total RNA는 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 추출하였으며 RNeasy columns (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 이용하여 정제하였다. 추출된 total RNA를 정량화하여 freezer에서 -80℃로 보관하였다. RNA의 purity와 integrity를 denaturing gel electrophoresis와 OD260/280 ratio를 이용하여 확인하였으며, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

RNA 합성과 정제 과정은 Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX, USA)을 사용하여 제조사가 제시하는 방법으로 biotin labeled cRNA를 제작하였다. 간단히 기술하면 first strand cDNA 합성은 550 ng의 RNA에 T7 oligo (dT) primer를 사용하여 역전

사(reverse transcription) 과정을 거쳤다. Second strand cDNA 합성은 DNA polymerase와 RNase H의 반응으로 single-strand cDNA를 double-strand DNA로 변환하였다. cDNA purification 후 *in vitro* transcription cRNA 합성 단계에서 biotin-NTP로 표지화된 cRNA를 증폭시킨다. cRNA purification 후 ND-1000 분광 측광기(NanoDrop, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 정량하였다.

Microarray 실험은 Whole-genome gene expression with IntelliHyb Seal System (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 제조사가 제시한 방법에 따라 실시하였다. 1.5 μ g의 labeled cRNA 시료에 GEX-HYB buffer 20 μ l를 첨가하여 Illumina HumanRef-8 v3 bead chip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)에 혼성화하여 16-18시간 동안 58°C 항온기에서 반응시켰다. Beadchip 세척은 High-Temp Wash buffer에서 10분 동안 55°C 항온기에서 반응 후 E1BC solution에서 5분간 세척하였다. 이 beadchip은 다시 100% ethanol에서 10분 그리고 E1BC solution에서 2분간 세척하였다. Beadchip은 wash tray로 옮겨 E1 buffer 4 ml를 가하여 10분 동안 반응 후 1 mg의 streptavidin-Cy3 (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK)를 첨가한 E1 buffer에서 10분 동안 반응시켰다. 최종적으로 E1BC solution에서 세척 후 원심분리기를 이용하여 beadchip을 건조시켰다.

Beadchip scan은 Illumina BeadArray Reader Confocal Scanner (Illumina Inc.)를 사용하여 제조사가 제시한 방법으로 진행하였다. Scanner로 도출된 beadchip image를 Illumina BeadStudio Gene Expression Module v3.3.8 (Illumina Inc.)로 분석하여 raw data를 추출하였다.

Raw data에서 얻어지는 “detection pvalue” 값을 이용하여, 50% 샘플에서 p-value < 0.05를 만족하는 리스트를 선별하여, Log2, Quantile normalization을 수행하였다.

샘플간의 비교로서, Fold-change가 사용되었으며, 유의한 차이를 지니는(|Fold| > 2) 유전자들 대상으로 데이터를 도식화하였다. 데이터 분석과 도식화에 ArrayAssist® (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 사용하였으며, Panther database (<http://www.pantherdb.org>)를 이용하여 해당 유전자들에 대해 ontology를 나타내었다.

4. RT-PCR analysis

RT-PCR분석에 사용된 total RNA는 위에 microarray analysis에 사용하고 남은 것을 사용하였다. Maxime RT-PreMix (Intron, Suwon, Gyeonggi, Korea)를 제조사의 지시대로 사용하여 RNA를 cDNA로 바꾸고, 분석하고자 하는 유전자의 cDNA는 Table 1에 명시된 각각의 특이 primer와 Maxime PCR Premix (Intron)를 이용하여 증폭하였다. 각 유전자들의 증폭산물은 denaturation (94°C, 3분), 30cycle의 amplification (94°C, 30초; 57°C, 30초; 72°C, 30초) 단계로 반응시킨 뒤, 72°C에서 7분간 반응 비활성화의 단계를 거친 뒤 얻었다. 각 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 되었고, 10분간 ethidium bromide용액으로 염색시켜 Gel-Doc (Bio-rad, Hercules, CA, USA)으로 관찰된 뒤, 이들에 대한 band intensity를 측정하였다. 측정된 각 유전자의 band intensity는 우선 각 GAPDH의 band intensity로 보정된 다음, MTA를 적용한 그룹의 band intensity를 대조군의 band intensity로 나누어 비율로 표시하였다.

Ⅲ. 결 과

6, 24, 72시간 중 어느 시간에서라도 fold값이 2배 이상 차이가 나는 유전자를 확인하였다. BeadChip에 표현된 24,546개의 유전자 중 총 178개의 유전자가 대조군과 비

Table 1. Primer sequence list in RT-PCR

| Target gene | Primer | | Molecular size(bp) |
|-------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|
| | Forward | Reverse | |
| GAPDH | GAA GTG GAA GGT CGG AGT C | GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC | 313 |
| FOSB | GGC TCA ACA AGG AAA AAT GC | GAG GCC AGA AAT TCC AAT CA | 297 |
| BHLHB2 | TGC TAT ACC CAG GCC TCA AC | TGT CTT GCT CCA AGC TCT GA | 153 |
| TUFT1 | GCA GAA AGA GGC AGA AGT CG | CCA AGC AGA ACG AGA AAA GG | 152 |
| DCN | GGA CCG TTT CAA CAG AGA GG | AAT GCC ATC TTC GAG TGG TC | 147 |
| THBS1 | CCT GTG CTG CAG ACA TTG AT | GAA CAC AAT CCG GAT CAG CT | 148 |
| FN1 | TGG ATG CTC CCA CTA ACC TC | GCA GTA CAA TGT GGG TCC CT | 150 |
| COL10A1 | CCA GGA GTC CCT GGT ATG AA | AGA GGT GAA AAT GGG GTT CC | 149 |

교하여 2배 이상의 차이를 보였으며 이중 109개의 유전자가 대조군보다 up-regulation되었으며 69개의 유전자가 down-regulation되었다. 이중 대조군과 비교하여 3배 이

상의 차이를 보이는 유전자들과 2배 이상 변화한 유전자들 중에서 세포의 증식과 분화에 관여하는 유전자들을 Table 2에 표시하였다.

Table 2. Biological processes classification of genes in MTA-treated cells. The genes that showed a difference of more than three-fold, and those considered to be related to differentiation and proliferation out of genes that showed a difference of more than two-fold are listed.

| SYMBOL | DEFINITION | ACCESSION | FOLD | | | BIOLOGICAL PROCESS |
|---------|---|-------------|-------|-------|-------|---|
| | | | 6hrs | 24hrs | 72hrs | |
| ACTA2 | actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2), mRNA. | NM_001613.1 | -1.08 | -1.22 | 3.25 | Intracellular protein traffic, Transport, Cell cycle, Cell structure and motility |
| ADAMTS1 | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 (ADAMTS1), mRNA. | NM_006988.3 | 1.16 | 1.7 | 3.15 | Protein metabolism and modification, Signal transduction, Developmental processes |
| ANGPTL4 | angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), transcript variant 1, mRNA. | NM_139314.1 | 1.99 | 1.53 | 3.3 | Immunity and defense |
| ANKRD1 | ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) (ANKRD1), mRNA. | NM_014391.2 | 1.44 | 2.1 | 3.19 | Biological process unclassified |
| BHLHB2 | basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (BHLHB2), mRNA. | NM_003670.1 | 2.47 | 3.55 | 2.54 | Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism, Developmental processes, Cell proliferation and differentiation |
| C5orf13 | chromosome 5 open reading frame 13 (C5orf13), mRNA. | NM_004772.1 | 1.16 | 2.81 | 4.04 | Biological process unclassified |
| C5orf46 | chromosome 5 open reading frame 46 (C5orf46), mRNA. | NM_206966.2 | 1.25 | 1.01 | 6.69 | Biological process unclassified |
| COL10A1 | collagen, type X, alpha 1 (COL10A1), mRNA. | NM_000493.3 | -1.13 | 1.16 | 2.88 | Signal transduction, Cell adhesion, Developmental processes, Cell structure and motility |
| CTGF | connective tissue growth factor (CTGF), mRNA. | NM_001901.2 | 1.03 | 1.39 | 2.06 | Signal transduction |
| CYFIP2 | cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2), transcript variant 3, mRNA. | NM_014376.2 | 1.23 | 1.03 | 3.18 | Signal transduction, Developmental processes |
| DACT1 | dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 1 (Xenopus laevis) (DACT1), mRNA. | NM_016651.4 | 1.53 | 3.16 | 2.62 | Biological process unclassified |
| DACT1 | dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 1 (Xenopus laevis) (DACT1), transcript variant 1, mRNA. | NM_016651.5 | 1.4 | 3.43 | 2.88 | Biological process unclassified |
| DCN | decorin (DCN), transcript variant A1, mRNA. | NM_001920.3 | -1.16 | -1.16 | -3.69 | Signal transduction, Developmental processes |

| | | | | | | |
|----------|--|----------------|-------|-------|-------|--|
| DCN | decorin (DCN), transcript variant A2, mRNA. | NM_133503.2 | -1.15 | -1.22 | -3.19 | Signal transduction, Developmental processes |
| DHRS3 | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3 (DHRS3), mRNA. | NM_004753.4 | -1 | -1.35 | -3.31 | Other metabolism |
| EDN1 | endothelin 1 (EDN1), mRNA. | NM_001955.2 | 2.83 | 3.11 | 1.71 | Signal transduction, Blood circulation and gas exchange, Cell proliferation and differentiation, Homeostasis |
| FN1 | fibronectin 1 (FN1), transcript variant 7, mRNA. | NM_054034.2 | -1.03 | 1.58 | 2.25 | Signal transduction, Cell adhesion, Intracellular protein traffic |
| FN1 | fibronectin 1 (FN1), transcript variant 6, mRNA. | NM_212474.1 | -1.03 | 1.6 | 2.1 | Signal transduction, Cell adhesion, Intracellular protein traffic, Cell structure and motility |
| FOSB | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB), mRNA. | NM_006732.1 | 2.17 | 1.49 | 1.24 | Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism, Developmental processes, Cell cycle |
| FZD8 | frizzled homolog 8 (Drosophila) (FZD8), mRNA. | NM_031866.1 | 1.47 | 1.87 | 3.63 | Biological process unclassified |
| GDF15 | growth differentiation factor 15 (GDF15), mRNA. | NM_004864.1 | 1.11 | 1.67 | 2.9 | Developmental processes |
| HMOX1 | heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1), mRNA. | NM_002133.1 | 3.56 | 2.05 | 1.48 | Coenzyme and prosthetic group metabolism |
| HSPA1A | heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA. | NM_005345.4 | 3.1 | -1.08 | 1.18 | Protein metabolism and modification, Immunity and defense |
| IGFBP3 | insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 2, mRNA. | NM_000598.4 | -1.12 | 1.21 | 4.59 | Signal transduction, Homeostasis |
| IGFBP3 | insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 1, mRNA. | NM_001013398.1 | 1.03 | 1.23 | 4.91 | Signal transduction, Homeostasis |
| IL11 | interleukin 11 (IL11), mRNA. | NM_000641.2 | 2.31 | 2.6 | 1.96 | Biological process unclassified |
| ITIH3 | inter-alpha (globulin) inhibitor H3 (ITIH3), mRNA. | NM_002217.3 | 1.17 | -1 | -3.67 | Protein metabolism and modification |
| KIAA1199 | KIAA1199 (KIAA1199), mRNA. | NM_018689.1 | -1.47 | -3.17 | -5.34 | Biological process unclassified |
| KYNU | kynureninase (L-kynurenine hydrolase) (KYNU), transcript variant 1, mRNA. | NM_003937.2 | -1.06 | -1.56 | -3.01 | Amino acid metabolism |
| LMCD1 | LIM and cysteine-rich domains 1 (LMCD1), mRNA. | NM_014583.2 | 2.54 | 4.31 | 2.95 | Biological process unclassified |
| LRRC15 | leucine rich repeat containing 15 (LRRC15), mRNA. | NM_130830.2 | -1.13 | 1.46 | 3.46 | Signal transduction, Cell adhesion, Immunity and defense |
| LRRC17 | leucine rich repeat containing 17 (LRRC17), transcript variant 2, mRNA. | NM_005824.1 | -1.03 | 1.52 | 4.58 | Signal transduction, Developmental processes |
| NOX4 | NADPH oxidase 4 (NOX4), mRNA. | NM_016931.2 | 1.19 | 3.44 | 3.99 | Electron transport |
| PDE5A | phosphodiesterase 5A, cGMP-specific (PDE5A), transcript variant 1, mRNA. | NM_001083.3 | -1.94 | -2.63 | -3.12 | Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism, Signal transduction |

| | | | | | | |
|----------|---|-------------|-------|-------|-------|---|
| PDGFC | platelet derived growth factor C (PDGFC), mRNA. | NM_016205.1 | -1.26 | 1.46 | 2.17 | Signal transduction, Developmental processes, Cell proliferation and differentiation |
| PENK | proenkephalin (PENK), mRNA. | NM_006211.2 | 1.09 | -1.29 | -6.18 | Signal transduction, Neuronal activities |
| PMEPA1 | prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1), transcript variant 2, mRNA. | NM_199169.1 | 2.3 | 6.12 | 5.46 | Biological process unclassified |
| PMEPA1 | prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1), transcript variant 2, mRNA. | NM_199169.1 | 2.12 | 5.98 | 3.97 | Biological process unclassified |
| PTH1H | parathyroid hormone-like hormone (PTH1H), transcript variant 3, mRNA. | NM_198964.1 | 2.01 | 1.44 | 1.29 | Developmental processes |
| PTH1H | parathyroid hormone-like hormone (PTH1H), transcript variant 1, mRNA. | NM_198965.1 | 2.11 | 1.83 | 1.37 | Developmental processes |
| SERPINE2 | serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2 (SERPINE2), mRNA. | NM_006216.2 | -1.06 | 2.29 | 3.08 | Protein metabolism and modification |
| SGK | serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK), mRNA. | NM_005627.2 | 1.25 | 1.84 | 3.38 | Protein metabolism and modification, Signal transduction, Apoptosis |
| SMAD6 | SMAD family member 6 (SMAD6), mRNA. | NM_005585.3 | -1.92 | -1.99 | -2.24 | Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism, Signal transduction, Immunity and defense, Developmental processes, Oncogenesis |
| SMYD3 | SET and MYND domain containing 3 (SMYD3), mRNA. | NM_022743.1 | -1.01 | 1.14 | 3.41 | Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism |
| SPOCK1 | sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1 (SPOCK1), mRNA. | NM_004598.3 | -1.2 | 1.1 | 3.31 | Biological process unclassified |
| THBS1 | thrombospondin 1 (THBS1), mRNA. | NM_003246.2 | -1.21 | 1.69 | 2.3 | Immunity and defense, Developmental processes |
| TMEM45A | transmembrane protein 45A (TMEM45A), mRNA. | NM_018004.1 | 1.07 | 1.77 | 3.52 | Biological process unclassified |
| TRIB1 | tribbles homolog 1 (Drosophila) (TRIB1), mRNA. | NM_025195.2 | 2.7 | 3.6 | 2.4 | Protein metabolism and modification, Signal transduction |
| TUFT1 | tuftelin 1 (TUFT1), mRNA. | NM_020127.1 | 1.4 | 2.78 | 1.95 | Developmental processes |

여기서 fold값이란 실험군이 대조군의 값에 대해서 실제로 몇 배의 차이가 있는지를(실험군의 값/대조군의 값)으로 살펴본 수치이다. 예를 들어, “2.8 fold”라면 대조군에 비해 실험군에서 2.8배 더 많이 발현된 것이고 “-5.5 fold”라면, 대조군에 비해 실험군에서 5.5배가 덜 발현됨을 의미한다.

178개의 유전자 중에서 up-regulation된 유전자와 down-regulation된 유전자를 biological process에 따라 분류하여 각각 Figure 1a, 1b에 표현하였다. Up-regulation된 유전자들 중에서는 신호의 전달(signal transduction), 발생 과정(development process), 단백질 대사

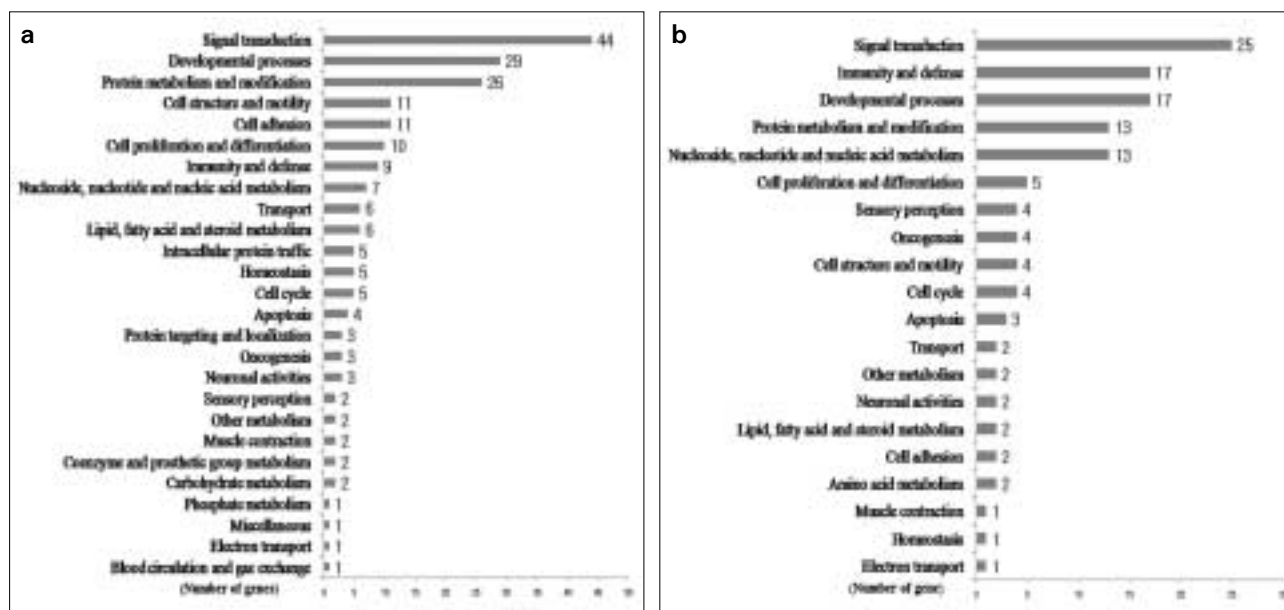


Figure 1. Differentially expressed genes (178 genes) up- or down-regulated by at least two-fold following a cellular treatment with MTA at every time point. (a) The biological processes of up-regulated 109 genes, (b) The biological processes of down-regulated 69 genes.

Table 3. The expression level of the messenger RNA determined by RT-PCR. RT-PCR was conducted three times. The relative level of gene expression was normalized against GAPDH messenger RNA, and the control was set as 1.0. Optical density values represent the mean.

| | 6hrs | 24hrs | | | | 72hrs | |
|---------|------|--------|-------|------|-------|-------|---------|
| | FOSB | BHLHB2 | TUFT1 | DCN | THBS1 | FN1 | COL10A1 |
| Control | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| MTA | 1.53 | 1.91 | 1.09 | 0.46 | 1.55 | 1.92 | 1.12 |

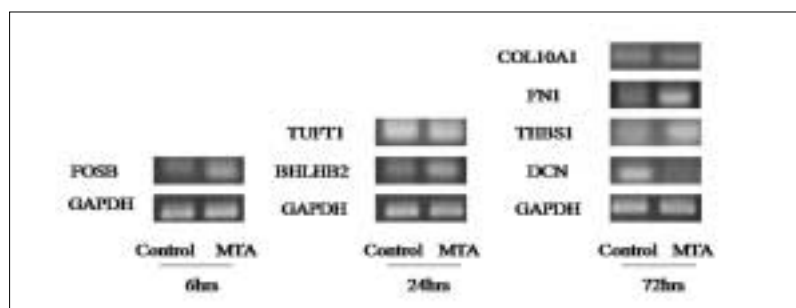


Figure 2. Optical density of messenger RNA measured by densitometry.

(protein metabolism), 세포의 구조와 운동성(cell structure and motility), 세포의 부착(cell adhesion), 세포의 증식과 분화(cell proliferation and differentiation)에 관여하는 유전자가 많았으며 down-regulation된 유전자들 중에서는 신호의 전달(signal transduction), 면역반응과 방어기전(immunity and defense), 발생 과정(development process), 단백질 대사(protein metabolism)에 관여하는 유전자가 많았다.

RT-PCR은 FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB), thrombospondin 1 (THBS1), basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (BHLHB2), fibronectin 1 (FN1), decorin (DCN), collagen, type X, alpha 1 (COL10A1), tuftelin 1 (TUFT1) 에 대하여 시행하였으며 그 결과는 Table 3, Figure 2에 표현하였다.

IV. 총괄 및 고찰

최근 들어 생체적합성이 뛰어난 MTA가 치수복조제제로 사용되었을 때 우수한 연구결과들을 보이고 있지만, 유전자 수준에서 MTA가 치수세포에 어떤 영향을 주는지에 대한 전반적인 정보는 많이 부족한 상태이다. 이번 연구는 MTA를 적용한 치수세포에서 발생하는 일련의 유전자 변화를 microarray로 보여준 최초의 연구이다. 이번 연구의 한계 내에서, 본 연구의 결과는 치수복조용 제제로서 MTA가 치수세포의 분화와 증식을 촉진시키고 상아질형성능력을 유도하는 유전자의 변화를 유도할 가능성을 시사하고 있다.

손상 받은 치수의 상부에서 수복상아질이 생성되기까지는 몇 단계의 과정을 거친다.²⁰⁾ 먼저, 치수에 존재하는 줄기세포나 전구세포(progenitor cell)가 손상 받은 부위로 모이게 된다. 이 세포들이 증식한 후 odontoblast-like cell이나 osteoblast-like cell로 분화한다. 마지막으로 세포의 기질을 생성하고 석회화 과정을 거치는 것이다.

MTA를 적용한 치수세포에서 odontoblast-like cell 혹은 osteoblast-like cell로의 분화를 유도하는 유전자들의 변화가 본 연구의 결과에서 확인이 되었다.

Drosophila protein인 mothers against decapentaplegic (Mad)와 C. elegans (Sma)의 homolog인 SMAD는 세포의 신호체계(cell signaling)에 작용을 하며 특히 BMP와 같은 TGF- β family를 조절하는 역할을 한다.²¹⁾ 포유류에서 확인된 SMAD 단백질은 8가지이며 이중 SMAD6는 Co-Smad인 SMAD4와 경쟁하는 inhibited Smad로 작용하는 것으로 알려져 있다.²²⁾ 본 실험에서 MTA를 6시간과 24시간 적용한 실험군에서 SMAD6가 감소하였으며 72시간에 가장 많이 감소하는 경향을 보였다(-2.24 fold). TGF- β family가 치수세포의 분화에 중요한 영향을 미친다고 알려진 것을 고려할 때 MTA에 의한 이러한 변화는 치수세포의 분화와 연관이 있을 것으로 사료된다.

FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB)는 본 실험에서 MTA를 6시간 적용한 실험군에서 2배 이상 발현되었다(2.17 fold). 세포의 분화와 증식에 관여하는 FOS family의 특성상 FOSB가 조상아세포와 조골세포에 미치는 영향에 관해서도 여러 가지 실험결과가 발표되었다. 기존 연구에서 체세포분열이 끝나 분화가 완료된 상태인 조상아세포와 분화가 완료되지 않은 상태인 외배엽성중배엽 세포(ectomesenchymal cell)가 포함된 치수세포에서의 FosB의 발현에는 유의성 있는 차이가 없다는 관찰결과를 근거로 FosB가 치수세포의 분화와 증식에는 영향을 주지 않는 것 같다고 보고하였다.²³⁾ 그러나 최근의 연구에서 FosB의 short splicing isoform인 deltaFosB가 골 형성을 촉진하는 것이 발견된 후 deltaFosB가 조골세포형성을 조

절하는 가능성이 제시되었다.²⁴⁾ MTA에 의한 치수세포상의 FOSB의 변화가 가지는 의미와 치수세포에서 조상아세포로의 분화와 증식과정에서 FOSB가 어떤 역할을 하는지에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

Basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 (BHLHB2)는 세포의 분화를 조절하는 유전자 중 하나이다. 본 실험에서는 BHLHB2가 MTA를 6, 24, 72시간 적용한 모든 실험군에서 2배 이상 증가하는 양상을 보였다(2.47, 3.55, 2.54 fold). BHLHB2는 중배엽성 줄기세포(mesenchymal stem cell)의 연골성 분화(chondrogenic differentiation)에 영향을 주는 것으로 알려져 왔다.²⁵⁾ 그러나 최근의 연구에서 중배엽성 줄기세포에 골형성을 유도하는 물질을 넣은 경우 BHLHB2가 많이 발현되며 지방형성을 유도하는 물질을 넣은 경우 적게 발현되는 현상을 보였다.²⁶⁾ 또 BHLHB2를 제거하였을 때 조골세포의 표현형(osteoblastic phenotype)을 억제하는 양상을 보였다. 이와 같은 사실에 주목해 보면 BHLHB2이 6, 24, 72시간에서 전반적으로 증가하는 양상이 MTA에 의한 경조직 형성의 과정의 일부분이라고 사료된다.

Thrombospondin 1 (THBS1)은 부착성 당단백질(adhesive glycoprotein)의 일종으로 세포간 상호작용이나 세포와 기질의 상호작용을 매개하는 기능을 한다.²⁷⁾ 또한 TGF- β 에 결합하여 이를 활성화시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ THBS1은 치수조직이나 치은조직에서는 관찰되지 않으며 오직 predentin에 분포하며 특히 조상아세포에서만 관찰된다.²⁹⁾ 이러한 현상을 종합해 볼 때 THBS1이 치수의 석회화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 본 실험에서 MTA를 72시간 적용한 실험군에서 THBS1이 2배 이상 증가하였다(2.30 fold). 이러한 증가는 MTA가 적용되었을 때 치수세포 혹은 줄기세포에서 조상아세포가 존재하는 환경으로 변화되는 것이라 추측할 수 있다.

Endothelin 1 (EDN1)은 vascular tone, 혈압, 그리고 나트륨과 물의 항상성(homeostasis) 등의 기전을 조절하는 등 다양한 기능을 가지는 것으로 알려진 21-amino acid peptide이다. 최근의 연구에서 EDN1이 치수의 혈관에서 관찰되었다.³⁰⁾ 또 다른 연구에서 endothelin receptor가 발육중인 치아조직에 다양하게 분포하는 것을 확인한 후 EDN1이 치아의 발생 과정에 다양한 기능을 할 가능성을 제시하였다.³¹⁾ EDN1은 섬유아세포에 작용하여 세포의 기질 단백질을 생성하며 특히 fibronectin의 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.³²⁻³⁴⁾ 최근의 연구에서 EDN1을 일차세포배양한 인간 치수세포에 적용시킨 경우 치수세포가 증식되고 mitogen 기전이 활성화되며 type I collagen의 합성이 증가하는 양상을 관찰하였으며 이를 근거로 EDN1이 치수의 치유와 치수세포의 분화에 중요한 역할을 할 것이라

고 추론하였다.³⁵⁾ 본 실험에서는 MTA를 6, 24시간 적용한 실험군에서 EDN1이 2배 이상 증가하는 양상을 보였다(2.83, 3.11 fold).

Interleukin 11 (IL11)은 골수의 기질세포(bone marrow stromal cell)에서 발견되며 여러 가지 기능을 가지는 cytokine의 하나이다. IL11의 중요한 기능 중 한 가지는 조골세포생성을 촉진 시키는 것이다.³⁶⁾ IL11이 조골세포의 분화와 골 생성을 촉진시키는 현상은 여러 연구에서 확인되었다.³⁷⁾ 또한 IL11을 정상보다 많이 발현하는 transgenic mice에서 골괴(bone mass)가 더 많이 형성된다는 사실이 발견되었다.³⁸⁾ 본 실험에서는 MTA를 6, 24시간 적용한 실험군에서 IL11이 2배 이상 발현되었다(2.31, 2.60 fold).

Fibronectin (FN)은 integrins, collagen, fibrin 등과 결합하는 세포의 기질 당단백질 중 하나이다. 세포의 부착, 성장, 이동, 그리고 분화에 영향을 미치며 창상 치유와 배아의 발생(embryonic development)에 중요한 역할을 한다.³⁹⁾ 치아가 생성되는 동안 dental basement membrane과 관계되어 관찰되는 FN은 조상아세포의 분화에 중요한 역할을 한다.⁴⁰⁾ 더욱이 FN은 조상아세포의 분극화(polarization)와 이동(migration)에 중요한 역할을 하여 치아의 형성과 수복상아질의 형성에 기여한다.⁴¹⁾ 최근의 연구에서 bovine plasma FN이 사람 치수세포의 부착과 이동에 영향을 주며 조상아세포로의 분화를 조절하는 역할을 한다고 주장하였다.⁴²⁾ 본 실험에서 FN은 72시간 실험군에서 2배 이상 증가 하였으며(2.10 fold) 이러한 현상이 치수세포내의 특정세포가 조상아세포로 분화하는 과정 중이라는 것을 증명한다고 사료된다.

이런 사실에 근거하여 치수세포에서 odontoblast-like cell이나 osteoblast-like cell로의 분화에 관여하는 유전적 흐름에 MTA가 미치는 영향이 비교적 이른 시기에 시작됨을 알 수 있다.

수복상아질을 형성함에 있어서 다른 단계인 석회화를 조절하는 단계와 관련된 유전자적 변화 역시 본 연구의 결과에서 확인할 수 있었다.

본 실험에서는 collagen fibrillogenesis와 성숙에 관련이 있는 decorin (DCN)이 72시간에서 급격히 감소하였다(-3.69 fold). Collagen 기질의 석회화 과정 중 DCN의 발현과 석회화의 반비례관계가 여러 연구에서 보고되었다. 석회화가 발생하기 전 DCN이 없어지거나 변성되는 것을 발견한 후 DCN이 석회화를 순간적으로 조절할 것이라는 주장이 제시 되었다.⁴³⁾ 최근의 연구에서 DCN을 정상보다 많이 발현하는 조골세포 clone과 정상보다 적게 발현하는 clone을 비교하였을 때 적게 발현하는 clone에서 석회화가 가속화되며 석회화 결절(mineralized nodule)의 수가 증가하는 것을 보고하였다.⁴⁴⁾ 본 실험에서 MTA를 적용한 후 나타나는 DCN의 급격한 감소가 MTA가 치수복조제제로

서 지니는 중요한 상아질 형성능력을 유전자 수준에서 뚜렷하게 반영하는 결과라고 생각한다.

Collagen, type X, alpha 1 (COL10A1)은 연골내 골화(endochondral ossification)이 일어나는 동안 발생하는 비후성 연골세포(hypertrophic chondrocyte)의 산물로 알려져 있다.⁴⁵⁾ 최근의 연구에서 발생중인 인간의 법랑질 organ과 법랑모세포에 Collagen type X이 다양하게 존재하는 것을 확인하였다.⁴⁶⁾ 아직까지 Collagen type X이 부족할 때 치아에서 생기는 변화에 대한 보고는 없으나 Collagen type X이 부족할 때 성장판 연골(growth plate cartilage)과 해면골(trabecular bone)에서는 구조이상이 관찰된다.⁴⁷⁾ 본 실험에서는 MTA를 72시간 적용한 실험군에서 COL10A1이 2배 이상 증가는 양상을 보였다(2.88 fold).

Tuftelin (TUFT)는 치아의 법랑질에서 발견되는 인산화된 당단백질(phosphorylated glycoprotein)이다. TUFT는 주로 상아질이 형성되는 시기 중 짧은 기간에만 나타나기 때문에 법랑질의 석회화를 시작시키는 물질로 지목되었다.⁴⁸⁾ TUFT는 특히 결정핵 생성(nucleation)과 성장(crystal growth)에 영향을 미친다. TUFT는 법랑질 형성의 초기에 분비성 법랑모세포(secretory ameloblast cell)에서 주로 관찰되며 특히 Tomes' process에서 주로 발견된다. 또한 법랑질이 형성되는 상아법랑질 경계 부위에서 집중되는 현상을 보인다.⁴⁹⁾ 본 실험에서는 MTA를 24시간 적용한 실험군에서 TUFT1은 2배 이상 증가하였다(2.78 fold). MTA를 적용한 치수세포에서 COL10A1과 함께 법랑질 형성과 관계되는 TUFT의 유전자가 발현되는 것은 재미있는 현상이라고 할 수 있다.

위에서 언급한 10개의 유전자는 microarray를 사용한 실험 결과 중에서 세포의 분화와 증식에 관여한다고 알려져 있는 유전자들을 찾아서 기존의 논문을 고찰하였으며 이중 비교적 변화가 명확한 유전자에 대하여 RT-PCR을 시행하였다.

MTA는 bio-inert material이라기 보다는 치수세포에 여러 가지 경로를 통해 영향을 주는 재료라고 생각된다. 특히 MTA는 치수세포의 분화와 증식에 관여하는 유전자의 변화에 영향을 미치며 석회화의 과정에 관여하는 유전자의 변화에 영향을 준다는 사실이 확인되었다. 앞으로 더 긴 시간 동안 관찰할 수 있는 실험과 다른 치수복조제제와의 비교 실험이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. American Association of Endodontists. Glossary of endodontic terms, 7th ed. pp. 40, 2003.
2. Cox CF, Subay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation fol-

- lowing direct pulp capping. *Oper Dent* 21:4-11, 1996.
3. Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 11:s55-63, 1998.
4. Cox CF, Tarim B, Kopel H, Gürel G, Hafez A. Technique sensitivity: biological factors contributing to clinical success with various restorative materials. *Adv Dent Res* 15:85-90, 2001.
5. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 25:197-205, 1999.
6. Torabinejad M, Hong CU, Pitt-Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 21:489-92, 1995.
7. Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Endod* 29:324-33, 2003.
8. Pitt-Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* 127:1491-4, 1996.
9. Yun YR, Yang IS, Hwang YC, Hwang IN, Choi HR, Yoon SJ, Kim SH, Oh WM. Pulp response of mineral trioxide aggregate, calcium sulfate or calcium hydroxide. *J Kor Acad Cons Dent* 32:95-101, 2007.
10. Bae JH, Kim YG, Yoon PY, Cho BH, Choi YH. Pulp response of beagle dog to direct pulp capping materials: Histological study. *J Kor Acad Cons Dent* 35:5-12, 2010.
11. Andelin W, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod* 29:646-50, 2003.
12. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 34:970-4, 2008.
13. Min KS, Yang SH, Kim EC. The Combined Effect of Mineral Trioxide Aggregate and Enamel Matrix Derivative on Odontoblastic Differentiation in Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 35:847-51, 2009.
14. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21:33-7, 1999.
15. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 29:532-39, 2001.
16. McLachlan JL, Smith AJ, Bujalska IJ, Cooper PR. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries. *Biochim Biophys Acta* 1741:271-81, 2005.
17. Syudo M, Yamada S, Yanagiguchi K, Matsunaga T, Hayashi Y. Early gene expression analyzed by a genome microarray and real-time PCR in osteoblasts cultured with a 4-META/MMA-TBB adhesive resin sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107:e77-e81, 2009.
18. So H, Park SH, Choi GW. The comparison of gene expression from human dental pulp cells and periodontal ligament cells. *J Kor Cons Dent* 34:430-41, 2009.
19. Yokose S, Kadokura H, Tajima Y. Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif Tissue Int* 66:139-44, 2000.
20. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 58:137-47, 2008.
21. Matsui S, Takeuchi H, Tsujimoto Y, Matsushima K. Effects of Smads and BMPs induced by Ga-Al-As laser irradiation on calcification ability of human dental pulp cells. *J Oral Sci* 50:75-81, 2008.
22. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signaling by the TGF- β superfamily. *Nature* 389:622-6, 1997.
23. Keklikoglu N. The localization of Fos B, a member of transcription factor AP-1 family, in rat odontoblasts and pulpal undifferentiated ectomesenchymal cells. *Folia Histochem Cytobiol* 42:191-3, 2004.
24. Sabatakos G, Sims NA, Chen J, Aoki K, Kelz MB, Amling M, Bouali Y, Mukhopadhyay K, Ford K, Nestler EJ, Baron R. Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med* 6:985-90, 2000.
25. Shen M, Yoshida E, Yan W, Kawamoto T, Suardita K, Koyano Y, Fujimoto K, Noshiro M, Kato Y. Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *J Biol Chem* 277:50112-20, 2002.
26. Iwata T, Kawamoto T, Sasabe E, Miyazaki K, Fujimoto K, Noshiro M, Kurihara H, Kato Y. Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Eur J Cell Biol* 85:423-31, 2006.
27. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* 12:634-40, 2000.
28. Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Höök M. Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell* 3:181-8, 1992.
29. Ueno A, Yamashita K, Nagata T, Tsurumi C, Miwa Y, Kitamura S, Inoue H. cDNA cloning of bovine thrombospondin 1 and its expression in odontoblasts and predentin. *Biochim Biophys Acta* 1382:17-22, 1998.
30. Casasco A, Calligaro A, Casasco M, Springall DR, Tenti P, Marchetti C. Immunohistochemical localization of endothelin-like immunoreactivity in human tooth germ and mature dental pulp. *Anat and Embryol* 183:515-20, 1991.
31. Neuhaus SJ, Byers MR. Endothelin receptors and endothelin-1 in developing rat teeth. *Arch Oral Biol* 52:655-62, 2007.
32. Guidry C, Hook M. Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts. *J Cell Biol* 115:873-80, 1991.
33. Marini M, Carpi S, Bellini A, Patalano F, Mattoli S. Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 220:896-9, 1996.
34. Khan ZA, Farhangkhoei H, Mahon JL, Bere L, Gonder JR, Chan BM. Endothelins: regulators of extracellular matrix protein production in diabetes. *Exp Biol Med* 231:1022-9, 2006.
35. Yan Y, Liu Z, Zhang WG. In vitro study of the effects of endothelin-1 on human dental pulp cells. *Chin J Dent Res* 2:5-13, 1999.
36. Kido S, Kuriwaka-Kido R, Imamura T, Ito Y, Inoue D, Matsumoto T. Mechanical stress induces Interleukin-

- 11 expression to stimulate osteoblast differentiation. *Bone* 45:1125-32, 2009.
37. Suga K, Saitoh M, Fukushima S, Takahashi K, Nara H, Yasuda S. Interleukin-11 induces osteoblast differentiation and acts synergistically with bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Interferon Cytokine Res* 21:695-707, 2001.
38. Takeuchi Y, Watanabe S, Ishii G, Takeda S, Nakayama K, Fukumoto S. Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice. *J Biol Chem* 277:49011-8, 2002.
39. Hynes R. Molecular biology of fibronectin. *Ann Rev Cell Biol* 1: 67-90, 1985.
40. Lesot H, Osman M, Ruch JV. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev Biol* 82:371-81, 1981.
41. Yoshida N, Yoshida K, Twaku M, Nakamura H, Osawa H. A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of FN in the odontoblast layer of human teeth. *Arch Oral Biol* 39:395-400, 1994.
42. Wang P, Hao J, Shi J. Actions of bovine plasma fibronectin on cultured human dental pulp cells. *Chin J Dent Res* 3:55-62, 2000.
43. Hoshi K, Kemmotsu S, Takeuchi Y, Amizuka N, Ozawa H. The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. *J Bone Miner Res* 14:273-80, 1999.
44. Mochida Y, Duarte WR, Tanzawa H, Paschalis EP, Yamauchi M. Decorin modulates matrix mineralization in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 305:6-9, 2003.
45. Alini M, Marriott A, Chen T, Abe S, Poole AR. A novel angiogenic molecule produced at the time of chondrocyte hypertrophy during endochondral bone formation. *Dev Biol* 176:124-32, 1996.
46. Felszeghy S, Hollo K, Modis L, Lammi, MJ. Type X collagen in human enamel development: a possible role in mineralization. *Acta Odontol Scand* 58:171-6, 2000.
47. Kwan KM, Pang MK, Zhou S, Cowan SK, Kong RY, Pfordte T. Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: Implications for function. *J Cell Biol* 136:459-71, 1997.
48. Deutsch D, Palmon A, Fisher LW, Kolodny N, Termine JD, Young MF. Sequencing of bovine enamelin ("tuftelin") a novel acidic enamel protein. *J Biol Chem* 266:16021-8, 1991.
49. Paine CT, Paine ML, Luo W, Okamoto CT, Lyngstadaas SP, Snead ML. A tuftelin-interacting protein (TIP39) localizes to the apical secretory pole of mouse ameloblasts. *J Biol Chem* 275:22284-92, 2000.

국문초록

Mineral Trioxide Aggregate가 인간치수세포에서 유전자 발현에 미치는 영향

김용범 · 손원준 · 이우철 · 금기연 · 백승호 · 배광식*

서울대학교 치의학대학원 치과보존학교실, 치의학연구소, BK21 Program

이 연구에서는 mineral trioxide aggregate (MTA)를 *in vitro*로 인간치수세포에 적용하였을 때 유전자들의 변화를 조사하였다.

실험군은 MTA를 teflon tube (직경 10 mm 길이 2 mm)에 담아 4시간 경화시킨 후 HDPCs에 적용하였고, 대조군은 빈 tube만을 적용하였다. 6, 24, 72시간 후 total RNA를 추출하여 microarray를 이용하여 분석하여, 2배 이상 또는 절반 이하의 변화를 보이는 유전자 중 선택적으로 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 사용하여 발현을 확인하였다.

24,546개의 유전자 중에서 109개의 유전자가 2배 이상 up-regulation되었으며(예. FOSB, THBS1, BHLHB2, EDN1, IL11, FN1, COL10A1, TUFT1) 69개의 유전자가 50%이하로 down-regulation되었다(예. SMAD6, DCN).

MTA는 bio-inert한 재료라기 보다는 치수세포에 다양한 경로로 영향을 주는 재료로 사료된다. 특히 치수세포의 분화와 증식에 관여하는 유전자의 변화에 영향을 주며 석회화 과정에 관여하는 유전자의 변화에 직접적인 영향을 주리라 사료된다.

주요단어: 치수복조, 치수세포, microarray, mineral trioxide aggregate, 세포분화, 세포증식