

상아질 접착에 대한 matrix metalloproteinase (MMP)의 영향과 이를 극복하기 위한 전략

이정현¹, 장주혜², 손호현^{1*}¹서울대학교 치의학대학원
치과보존학교실²서울대학교 치과병원 장애인구강
진료실

Effects of matrix metalloproteinases on dentin bonding and strategies to increase durability of dentin adhesion

Jung-Hyun Lee¹, Juhea Chang², Ho-Hyun Son^{1*}¹Department of Conservative Dentistry, Seoul National University School of Dentistry, Seoul, Korea²Clinic for Persons with Disabilities, Seoul National University Dental Hospital, Seoul, Korea

The limited durability of resin-dentin bonds severely compromises the longevity of composite resin restorations. Resin-dentin bond degradation might occur via degradation of water-rich and resin sparse collagen matrices by host-derived matrix metalloproteinases (MMPs). This review article provides overview of current knowledge of the role of MMPs in dentin matrix degradation and four experimental strategies for extending the longevity of resin-dentin bonds. They include: (1) the use of broad-spectrum inhibitors of MMPs, (2) the use of cross-linking agents for silencing the activities of MMPs, (3) ethanol wet-bonding with hydrophobic resin, (4) biomimetic remineralization of water-filled collagen matrix. A combination of these strategies will be able to overcome the limitations in resin-dentin adhesion. (*Restor Dent Endod* 2012;37(1):2-8)

Key words: Biomimetic remineralization; Chlorhexidine; Cross-linking agent; Dentin bonding; Ethanol wet-bonding; Matrix metalloproteinase

Received September 6, 2011;
Last Revision November 18, 2011;
Accepted November 18, 2011.¹Lee JH, DDS, PhD student, Resident;
Son HH, DDS, PhD, Professor,
Department of Conservative
Dentistry, Seoul National University
School of Dentistry, Seoul, Korea²Chang J, DDS, PhD, Professor; Clinic
for Persons with Disabilities, Seoul
National University Dental Hospital,
Seoul, Korea

*Correspondence to

Ho-Hyun Son, DDS, PhD.
Professor, Department of
Conservative Dentistry, Seoul
National University School of
Dentistry and Dental Research
Institute, 101 Daehag-ro, Jongro-gu,
Seoul, Korea 110-749
TEL, +82-2-2072-2652; Fax, +82-
2-2072-3859; E-mail, hhson@snu.
ac.kr

서론

최근 몇 년간 상아질 접착분야는 급속도로 발전해 왔다. 현재의 상아질 접착 시스템은 산성 conditioner를 도포하여 상아질 표면을 탈회시키고, 탈회시킨 상아질 기질에 접착 레진을 침투시켜 '혼성층'을 형성한다. 혼성층은 type 1 콜라겐 원섬유와 proteoglycan과 이를 감싸는 레진 중합체로 구성된다.

대부분의 상아질 접착제는 중합수축에 저항하기에 충분한 접착강도를 가지며, 접착 직후에는 높은 접착강도를 나타낸다. 하지만, 접착제와 상아질 간 결합의 내구성은 여전히 의문시된다. 레진과 상아질의 접착강도는 6개월의 짧은 관찰기간 동안에도 유의할만한 감소 경향을 나타내었다.¹ 많은 연구에서 현재의 친수성 상아질 접착제에 의한 레진-상아질 결합은 시간이 경과함에 따라 파괴되는 것이 확인되었다.¹⁻⁴ 또한 여러 *in vivo* 연구에서도, 노화된 레진-상아질 계면에서 콜라겐의 가수분해 및 레진 용출의 형태학적 증거가 관찰되었다.^{2,3,5}

Etch-and-rinse 시스템에서는 탈회된 상아질로의 레진 단량체의 확산이 상아질의 깊이에 따라 점차 감소하는 것으로 나타났다.⁶ 이것은 혼성층 하부에 레진에 의해 보호되지 못하는 취약한 콜라겐 원섬유를 노출시키는 결과를 초래한다. 산부식과 프라이밍이 한번에 진행되는 self-etch system에서도 혼성층 내로의 레진 확산이 불충분한 것으로 관찰되었다.⁷ 노출된 콜라겐 원섬유와, 수분으로 채워진 원섬유간 공간은 레진에 의해 보호되지 못하기 때문에 구조적으로 불안정하며, 장기간의 접착 강도 감소를 초래한다. 또한 숙주 유래의 matrix metalloproteinase (MMP)에 의한 콜라겐 가수분해에 취약한 부위가 된다.

이에 본 종설 논문에서는, 상아질 접착 붕괴에 미치는 MMP의 영향과 이를 극복하기 위해 최근 연구되고 있는 전략들에 대해 소개하고자 한다.

상아질 내 MMP의 구조, 성질 그리고 기능

최근 사람에 존재하는 다양한 MMP와 기질 그리고 유전자가 동정되었다. 일반적으로, MMP는 prodomain, 아연 결합부위를 포함하는 catalytic domain, hinge region, hemopexin domain을 가진다.⁸ Catalytic domain은 콜라겐에 결합하여 콜라겐을 자를 수 있도록, cysteine기가 반복적으로 나타나며 효소의 활성화에 필요한 아연이온의 결합부위가 존재한다. Prodomain은 효소를 비활성화 상태로 유지시키며, 활성화 시 분리된다. MMP family 내에서 고도로 보존된 특정 아미노산 서열이 확인되었으며, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)에 의해 활성이 억제된다.⁹

조상아세포는 MMP-2, 8, 9, 14, 20을 합성하고 분비한다. 이중 상아질 내에서 가장 많이 존재하는 것은 MMP-2와 MMP-9로, 이들은 관간 상아질 내 콜라겐 원섬유 망과 콜라겐 원섬유를 따라 주로 존재한다.¹⁰

MMP는 세포외기질을 가수분해하며, 발생, 정상 조직 재구성, 혈관 신생 등의 생리학적 과정에 핵심적인 역할을 한다. 상아질 발생은 여러 종류의 단백질분해효소가 요구되는 복잡한 발생과정으로, 주로 MMP family가 관여한다.^{11,12} 최근 연구에서 MMP가 치아 우식, 치주 질환의 진행, 그리고 상아질 접착에도 영향을 준다는 것이 밝혀졌다.¹³⁻¹⁵

상아질 접착에 있어서 MMP의 분비와 활성화 그리고 영향

MMP의 효소활성을 위해서는 칼슘, 아연과 같은 금속 이온이 필요하다. 대부분의 MMP는 조상아세포에 의해 proenzyme의 형태로 합성, 분비되며, pH가 낮은 환경에서 catalytic domain의 cysteine switch, prodomain의 절단 등의 과정을 거쳐서 활성화 된다.¹² 산성 환경은 MMP를 활성화시킨다.¹³ pH 변화는 cysteine switch와 같은 경로를 통해 propeptide의 입체구조를 바꾼다. 현재 사용되는 상아질 접착제는 산성을 띄기 때문에 접착 과정에서도 MMP가 활성화될 수 있다. Etch-and-rinse adhesive와 self-etching adhesive 모두 탈회된 상아질의 MMP를 활성화시킬 수 있다는 것이 실험적으로도 밝혀졌다. 특히 self-etching adhesives는 MMP를 최대치로 활성화시키며, 이것이 장기간의 상아질-레진 접착의 붕괴를 유발한다.¹⁶ 즉, self-etching adhesive의 primer는 pH 1.5 - 2.7의 산도를 갖고 있기 때문에, 접착 과정 동안 MMP의 콜라겐 분해 활성을 14 - 15배 증가시키는 것으로 나타났다.¹⁶ 결국, adhesive가 충분히 침투하지 못한 레진-상아질 계면의 콜라겐 원섬유는 활성화된 효소에 의해 분해된다.

또한 2-step etch-and-rinse adhesive도 인산으로 산부식한 상아질 분말에 적용시 콜라겐 분해 활성을 증가시키는 것으로 나타났다.¹⁷ 인산의 높은 산도 때문에 산부식 직후의 MMP 활성은 감소하지만, one-bottle etch-and-rinse adhesive는 상아질내의 MMP를 재활성화시킨다. 이는 one-bottle etch-and-rinse adhesive를 사용한 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 혼성층이 분해되는 이유가 된다.^{17,18}

장기간 성공적인 레진-상아질 접착은 상아질 기질로 레진 단량체를 완전하게 침투시켜 균일하고 단단한 혼성층을 형성하는데 달려있다. 여러 논문에서 상아질 접착 후 혼성층의 콜라겐 가수분해에 의한 접

착 실패에 대한 형태학적인 증거를 보고한바 있다.¹⁻⁵ 혼성층내의 콜라겐 원섬유의 분해는 노출된 콜라겐이 존재함을 의미한다. 이는 탈회된 상아질 기질로 레진이 충분히 침투하지 못해, 혼성층 하부에 노출된 콜라겐 원섬유의 존재가 관찰되면서 증명되었다.¹⁹ Self-etch adhesive는 산부식과 프라이밍을 동시에 할 수 있지만, 레진 침투는 여전히 불충분하다.⁷

상아질로의 불충분한 레진 침투뿐만 아니라, 상아질 내의 수분 또한 MMP에 의한 콜라겐 분해에 필수적이다. MMP는 가수분해효소이기 때문에 레진-상아질 계면의 콜라겐의 펩타이드 결합을 분해하는 데는 외부의 수분이 필요하다. 최근 한 연구에서, 물 대신 미네랄 오일에 침지한 치아시편에서는 레진-상아질 결합의 접착강도가 유지된다는 것이 확인되면서 수분이 레진-상아질 결합의 분해에 중요한 역할을 한다는 것이 증명되었다.²⁰ 또한 인공타액에 250일간 침지한 탈회된 상아질 시편에서는 콜라겐이 완전히 파괴되었지만, 미네랄 오일에 같은 기간 침지한 상아질 시편에서는 콜라겐이 온전히 보존되었다는 Pashley의 실험결과도 이와 일치한다.¹³

결론적으로, 숙주유래의 MMP는 혼성층 형성시 레진 단량체가 불충분하게 침투하여 발생한 노출된 콜라겐 원섬유의 장기적인 분해에 일조한다. 그리고 콜라겐 원섬유의 분해는 레진-상아질 접착 실패를 야기한다.

MMP에 의한 접착 분해를 막기 위한 실험실적인 전략

1. MMP의 저해

MMP는 불충분하게 레진이 침투된 혼성층의 콜라겐 원섬유를 분해시키며, 콜라겐 기질의 기계적 성질을 감소시킨다. 이를 해결하기 위해 레진-상아질 접착의 내구성을 증진시키기 위해 상아질 접착제 적용 전, MMP 저해제를 사용하는 방법이 제안되었다.¹⁵ 현재 MMP를 효과적으로 저해하면서 적절한 성질을 갖는 MMP 저해제는 몇 종류에 불과하다. Chlorhexidine (CHX), biguanide계 항균제 등이 MMP-2, -8, -9의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이 중 CHX가 상아질 접착 과정에서 널리 연구된 MMP 저해제이다.

CHX를 항균제로 사용하는 장점 중 하나는 광화된 상아질에 최대 12주간 결합할 수 있는 substantivity가 있다는 것이다.²¹ 또한 최근 연구에서, 탈회된 상아질은 광화된 상아질에 비해 더 많은 CHX와 결합할 수 있다는 것이 확인되었다.²² 비록 CHX와 상아질의 결합이 정전기적인 결합이기 때문에 가역적이지만, CHX는 HEMA 적용 후에도 탈락하지 않으며, 접착과정 후에도 탈회된 상아질에 잔존한다.²²

MMP의 활성을 억제하기 위해 etch-and-rinse adhesive에 적용하는 정해진 방법은 없으나 추천되는 방법은, 산부식, 수제한 상아질 표면에 2%의 CHX를 약 1분간 적용한 후 blot dry 후 통상의 접착 과정을 진행하는 것이다. *In vivo* 연구에서, 산부식 후 CHX를 처리한 그룹에서 접착 강도가 유지됨을 확인할 수 있다.²³

하지만 CHX의 상아질 결합이 정전기적이기 때문에, 결국에는 상아질 내 CHX는 타액이나 상아세관의 양이온에 의해 치환된다. 이것은, 산부식한 상아질에 CHX를 적용한 후 현재 시판중인 상아질 접착제를 이용해 상아질 접착을 시행한 결과, 9개월 후에는 접착이 유지되었지만, 18개월 후에는 혼성층의 심각한 파괴가 관찰된 *in vitro* 실험 결과와 일치한다.²⁴

이러한 단점을 보완하기 위해, self-etch adhesive 시스템에서 CHX를 직접 산성 primer에 혼합시키는 실험이 있었다.²⁵ 하지만, 레진 단량체에 직접 CHX를 혼합하는 것은 한계가 있다. 레진에 1 - 2%의 CHX를 혼합할 경우, 레진의 중합률에는 두드러진 영향을 주지 않으나, 중합된 레진의 물성에 부정적인 영향을 준다. 예를 들면, 1% CHX를 다양한 종류의 레진 혼합물에 포함시켰을 때, 중합된 레진의 탄성계수가 27 - 48% 감소하는 것으로 나타났다.²⁶ 또한, 레진 내에 포함된 CHX가 서서히 방출되면서, MMP 억제효과 또한 시간의 흐름에 따라 감소한다.²⁷

또 다른 비특이적 MMP 저해제로 MMP assay kit에서 참고 저해제(reference inhibitor)로 사용되는 GM6001 (galardin)이 있다. Galardin을 산부식한 상아질에 적용 후 상아질 접착제를 사용했을 때 12개월 동안 혼성층이 잘 보존되었다.²⁸ Tetracycline 또한 효과적인 비특이적 MMP 저해제이며, 치주 질환의 치료에 사용되고 있다. 하지만 tetracycline은 광산화에 의해 치아를 변색시키기 때문에 혼성층의 보존을 위해 사용되지는 않는다.

2. Cross-linking agent를 이용한 MMP silencing

최근 glutaraldehyde, genipin, proanthocyanidin, carbodiimide와 같은 cross-linking agent를 사용하여 탈회된 상아질의 콜라겐의 cross-link를 증가시켜 레진-상아질 결합의 내구성을 증가시키기 위한 시도가 이루어졌다.²⁹ 이러한 *in vitro* 실험 결과, cross-linking agent를 사용하였을 때 상아질 콜라겐의 단기간 물성이 증가하였고, collagenase에 의한 콜라겐 분해가 감소하였으며, 레진-상아질 계면의 안정성이 증가하였다.

하지만 상아질 내 콜라겐은 이미 고도로 cross-link되어 있기 때문에, cross-linking agent에 의해 레진-상아질 결합의 물성이 증가한 것이 단지 콜라겐의 cross-link를 증가시키기 때문이라고 해석하는 것은 무리가 있다. 예를 들면 proanthocyanidin은 콜라겐의 cross-link를 증가시킬 뿐 아니라 MMP-2와 9의 억제효과도 가지고 있다.³⁰ 최근 논문에서는 콜라겐 cross-linking agent의 MMP silencing 효과는 cross-linking agent가 효소의 입체 구조를 변화시키기 때문인 것으로 분석하고 있다.³¹ 즉, cross-linking agent는 MMP의 catalytic domain 구조의 비가역적인 변화를 일으키거나, 콜라겐 분해에 관여하는 modular domain의 allosteric inhibition을 통하여 MMP를 억제하며, 이것이 레진-상아질 접착을 안정화하는데 기여한다는 것이다.³²

Cross-linking agent는 catalytic domain 내의 아미노산 사이에 다수의 비가역적인 cross-link를 형성하여, 효소의 3차원적 구조의 변화를 일으키거나, catalytic domain의 cleft-like structure의 굴곡성을 변화시켜 type 1 콜라겐을 인식하고, 결합하는 것을 막는다.³³ 또한 cross-linking agent는 non-catalytic domain의 allosteric inhibition을 통해서도 MMP를 억제할 수 있다. MMP의 hemopexin-like domain은 콜라겐 원섬유의 3중나선을 풀어, 나중에 catalytic domain이 collagen을 절단할 수 있도록 하는데, cross-linking agent에 의해 이 부위의 cross-linking이 일어나면 MMP의 콜라겐 분해 활성은 억제된다.³⁴ 이것은 glutaraldehyde, diphenylphosphorylazide, carbodiimide와 같은 cross-linking agent에 의해 MMP-2와 9의 활성이 억제된 실험 결과에 의해 증명된다.³⁵

그러나 MMP 저해제와 마찬가지로, cross-linking agent의 가장 큰 단점은, hybrid layer 내 레진의 침투가 불충분한 부위의 취약한 기계

적 성질을 근본적으로 보강해주지 못한다는 것이다. 탈회된 상아질 내 콜라겐의 탄성 계수는 8 MPa로, cross-linking agent에 의해 콜라겐 내의 cross-link가 증가한다고 해도 최대 0.4 GPa를 넘지 못한다.³⁶ 이것은 레진이 잘 침투한 상아질(3 - 5 GPa)과 광화된 상아질(20 GPa)의 탄성계수에 비해 턱없이 낮은 수치이다.^{34,37,38} 그러므로 혼성층 내 레진이 불충분하게 침투한 콜라겐 원섬유는 지속적인 부하에 의해 파괴되기 쉬운 취약한 부위가 된다. 이것은 레진-상아질 결합의 파괴를 막기 위해, 혼성층 내 노출된 콜라겐 원섬유의 기계적 성질을 보강할 수 있는 다른 전략이 필요함을 시사한다.

3. 에탄올 습윤 접착

현재의 상아질 접착 시스템은, 극성 용매를 사용하여 콜라겐 기질 주변의 수분을 대체하고, 극성 용매를 증발시켜 친수성 레진 단량체의 농도를 증가시켜 접착을 얻는다. 수분으로 포화된 콜라겐 기질을 100% 알코올로 전처리하면, 소수성 레진 단량체의 상분리 없이 위와 비슷한 효과를 얻을 수 있다. 수분 대신 에탄올을 이용한 습윤 접착은 탈회된 콜라겐 기질 내로 직접 소수성 레진을 침투시킬 수 있다는 장점이 있다. 소수성 레진 단량체를 사용한 레진-상아질 접착 계면은 수분 흡수 및 수분 용해성, 레진 가소성, 효소에 의한 콜라겐 분해 등이 감소하여, 내구성 있는 레진 접착을 얻을 수 있다.²⁴

탈회된 콜라겐 기질 주변의 수분이 에탄올로 교체되면, 콜라겐 기질은 에탄올에 부유한 채로 소수성을 띄게 된다. BisGMA와 TEGDMA와 같은 소수성 레진 단량체들도 에탄올에 용해되어 에탄올에 포화된 콜라겐 기질내로 완전하게 침투할 수 있게 된다.³⁹ 콜라겐 기질내로의 레진 단량체의 침투는 확산 기술기에 의존하는데, 최근 two-photon laser confocal microscopy를 통한 연구에서 에탄올 습윤 접착을 통해 형성된 혼성층 내에 소수성 레진이 균일하게 분포함이 확인되었다.⁴⁰

에탄올 습윤 접착은 두가지 방법으로 적용할 수 있다. 첫 번째 방법은 산부식한 상아질에 100% 에탄올을 1분간 적용 후 에탄올을 용매로 한 소수성 레진 단량체 혼합액을 적용하는 단순화된 술식이다.⁴¹ 이 방법은 술식이 간단하여 임상적으로 적용 가능하지만, 매우 높은 기술이 요구되며, 부가적으로 상아세관을 폐쇄시키는 약제를 사용하지 않으면, 상아세관액의 흐름 때문에 수분을 완전히 제거할 수 없다는 단점이 있다.⁴² 또 다른 방법은 점차적으로 높은 농도의 에탄올을 적용하는 방법으로, 콜라겐 기질 내의 수분이 점진적으로 제거된다.^{24,42} 탈회된 상아질에, 50%, 70%, 80%, 95%의 에탄올을 순차적으로 30초씩 적용하고 100% 에탄올을 30초간 3회 적용 후 소수성 레진 단량체 혼합액을 적용하는 방법이 실험실적으로 행해졌다.^{24,42} 이 방법은 적용시간이 길어 임상에서 사용할 수 없다는 단점이 있다. 또한, 두 방법 모두 에탄올 적용 시 상아질의 콜라겐이 건조될 경우, 공기-콜라겐 계면에 존재하는 표면장력 때문에 콜라겐 기질이 붕괴되고 레진 단량체가 콜라겐 기질로 완전하게 침투하지 못하게 된다.³⁹

상아질에 소수성 레진을 적용하는 것이 어렵기 때문에, 에탄올로 포화된 상아질에 친수성 레진 단량체를 적용하는 방법이 고안되었다. 친수성 레진 단량체를 이용한 에탄올 습윤 접착의 접착 강도가 통상의 습윤 접착을 사용했을 때 보다 높은 것으로 나타났다.⁴⁴ 현재 시판중인 etch-and-rinse adhesive를 일반적인 습윤 접착과 에탄올 습윤 접착으로 적용했을 경우 에탄올 습윤 접착을 통해 형성된 혼성층의 미세투과도가 현저히 낮았다.⁴⁰ 이 결과는 에탄올을 이용한 습윤 접착은 친수성

레진을 사용하더라도 콜라겐 기질의 레진 흡수율을 높이고, 더 우수한 혼성층이 형성된다는 것을 의미한다. 또한 에탄올은 친수성 접착제의 레진 중합율을 증가시키는 것으로 나타났다. 하지만, 친수성 레진 사용 시 에탄올을 완전히 제거하지 않으면, 소수성 레진을 사용했을 때 보다 중합된 기질의 수분 흡수가 높아지고 장기적으로는 레진-상아질 접착이 불안정해진다.⁴⁵ 따라서 상아질 접착 시 소수성 레진을 사용하는 것이 레진-상아질 접착의 내구성을 증진시킨다.

에탄올 습윤 접착에 의해 형성된 혼성층은 콜라겐 원섬유의 직경은 감소하고, 섬유 사이의 공간은 증가한 것으로 관찰되었다.⁴³

이것은, 콜라겐 매트릭스로의 레진 흡수가 증가되는 효과를 가져오며, 혼성층의 기계적인 성질을 증가시킨다. 또한, 에탄올 습윤 접착을 적용 시 콜라겐 기질의 섬유 사이 공간뿐만 아니라, 섬유 내 공간까지 완전하게 레진을 침투시킬 수 있다. 이 두 가지 효과 모두 통상의 습윤 접착을 사용해서는 얻을 수 없다.

최근 연구에서 에탄올 습윤 접착을 통해 얻어진 레진-상아질 결합은 MMP 저해제가 없어도 18개월간 보존된 것으로 나타났다.⁴⁶ 이것은 MMP가 수분이 없는 환경에서는 콜라겐을 분해할 수 없다는 점에서 의미있다. 에탄올 습윤 접착을 적용하면 MMP의 효소활성에 필요한 수분이 완전히 제거되기 때문에 MMP의 가수분해 능력이 소실되고, 콜라겐 기질 내로 소수성 레진을 완전히 침투시키면, MMP의 catalytic, allosteric domain이 고정되어 MMP가 콜라겐을 분해하지 못하게 된다. 만약 친수성 레진을 사용하여 습윤 접착을 적용하면, 초기에는 친수성 레진 단량체가 콜라겐 기질에 완전히 침투하여 MMP를 고정시킬 수 있지만, 레진이 esterase에 의해 분해되고, 수분이 레진 내로 흡수되면 고정되었던 MMP가 재활성화된다.

4. Biomimetic remineralization

치아의 형성 시, 광화된 콜라겐에 수산화인회석이 순차적으로 침착되는 것은 상아질의 기계적 성질을 증가시킬 뿐 아니라, 수분보다 큰 분자를 제거한다는 점에 있어서 중요하다.⁴⁷ 40 kDa보다 큰 분자는 type I 콜라겐의 주변 구획에서 제거되고, 6 kDa보다 작은 분자는 콜라겐 원섬유 내로 확산된다.⁴⁸ 즉, 광화 기간 동안 숙주의 성장 인자, 신호 분자, MMP 등은 수산화인회석 결정에 둘러 쌓인 채 상아질 내에 '화석화(fossilized)' 된다. 그리고 콜라겐의 광화가 더 진행되면, 콜라겐에 느슨하게 결합되어 있던 수분도 수산화인회석 결정으로 치환된다. 이러한 생리학적인 탈수 과정은 광화된 콜라겐 원섬유를 안정화시키고 효소에 의한 분해로부터 장기간 온전하게 보존될 수 있도록 한다.⁴⁹

상아질 접착 과정에서, 상아질의 무기질을 산, 산성 레진 단량체 등으로 의도적으로 제거하고 콜라겐을 노출시켜 레진의 미세기계적 유지를 얻는다. 하지만, 현재의 상아질 접착 시스템은, 콜라겐 주변의 수분을 완전히 레진 단량체로 치환시키지 못한다. Biomimetic remineralization은 이러한 레진-상아질 접착의 한계를 극복하기 위해, 생체에서 일어나는 광화 과정을 모방한 개념적인 전략이다. 이 방법은 혼성층 내의 레진의 밀도가 희박한 부위의 수분을 수산화인회석 결정으로 치환시키는 것으로, 섬유 내, 섬유 외 공간 모두에서 수산화인회석 결정이 형성된다.⁵⁰ 즉, 치아 발생 중의 광화 과정과 마찬가지로, MMP를 무기물 사이에 화석화시킴으로써, 레진-상아질 접착의 영속성을 보존할 수 있다. 실제로 시판중인 상아질 접착제를 처리한 상아질

에 biomimetic remineralization을 적용하였을 때 상아질의 탄성 계수가 55 - 118% 증가한 것이 확인되었다.⁵¹

탈회된 상아질의 재광화는 새로운 것이 아니다. 불소, 수산화 칼슘 등을 이용한 우식이 있는 상아질의 재광화는 50여년 전부터 문헌상으로 보고되어 왔다. 나노 기술에서 이러한 방식의 재광화는 'top-down' 기법으로 분류할 수 있다. 그러나 재광화를 위해 모결정이 반드시 필요하기 때문에, 이 기법으로는 혼성층 내의 레진이 덜 침투한 부위의 재광화를 이룰 수 없다.

생체의 광화 과정 중에는, 유기 비계(organic scaffold) 내에 수산화인회석 모결정이 존재하지 않으며, 동종 핵형성을 통해 광화가 진행된다. 동종 핵형성은 세포외 기질 단백질에 의한 무정형 무기물의 sequestration을 통해 일어나며, 여기에 산성 기질 인산단백질이 무기질의 핵형성과 결정 성장을 위한 주형의 역할을 한다.⁵²

동종 핵형성은 열역학적으로 유리하지 않기 때문에, 결정 형성을 위한 활성화 에너지를 낮추기 위해 단백질/고분자에 의해 조절되는 단계적인 상 변이를 통해 일어난다. 이러한 광화를 'bottom-up' 기법이라고 한다.⁵³

Biomimetic remineralization시 생체의 광화 과정의 기질 단백질의 역할을 모방한 sequestration analog와 template analog를 사용한다. Sequestration analog는 DMP-1의 aspartic acid와 C-terminal domain을 모방하여, 무정형 인산 칼슘을 안정화시켜 상아질 콜라겐의 섬유 내 공간 내로 침투시키는 역할을 한다. Polyacrylic acid와 같은 polycarboxylic acid를 sequestration agent로 사용하고 있다.⁵⁴ Templating analog는 기질 인산단백질의 역할을 모방한 것으로, 콜라겐에 결합하여 초기 무정형 무기질의 수산화인회석 결정화와 성장을 유도하며 polyvinylphosphonic acid를 사용한다.⁵⁵ 정상적인 광화된 상아질에서 관찰되는 수산화인회석 결정을 만들어내기 위해서는 sequestration analog와 templating analog가 함께 사용되어야 한다.

Etch-and-rinse adhesive와 self-etch adhesive를 사용해 얻어진 혼성층에서 biomimetic mineralization을 통한 재광화가 일어난다는 것이 확인되었다.^{56,57} 이것은 바꾸어 말하면, 현재의 습윤 접착으로는 혼성층 하방의 콜라겐 원섬유 주변으로 레진 단량체가 완전히 침투하지 못하기 때문에, 수산화인회석 결정이 성장할 수 있는 공간이 남아있다는 의미가 된다. Etch-and-rinse adhesive에 의해 얻어진 혼성층 내에서 apatite 결정은 섬유 내, 섬유 외 공간 모두에서 발견되었으며, 혼성층 내 재광화가 일어난 부위는 레진-상아질 결합이 노화에 의해 분해된 부위와 일치했다. Self-etching adhesive를 사용한 혼성층에서 재광화는 거의 대부분 섬유 내 공간에서 일어났으며, 이는 섬유 외 공간의 레진 침투가 Etch-and-rinse adhesive를 사용했을 때보다 더 잘 일어났음을 의미한다.

재광화가 일어나기 위해서는 건전한 콜라겐 원섬유가 필수적이다. 그러나, 이미 존재하는 모결정 상에서 결정이 정렬된 성장을 하는 'top-down' 기법과는 달리, biomimetic remineralization은 완료되는데 보통 3 - 4개월이 필요한 느린 반응이다. 그러므로 재광화 과정 동안 콜라겐 기질이 분해되는 것을 막는 것이 중요하다. 최근 template analog로 사용되는 polyvinylphosphonic acid가 MMP 저해 효과를 갖고 있다는 것이 밝혀졌다.⁵⁸ 이러한 MMP 억제능력은 polyvinylphosphonic acid가 아연 이온을 킬레이션하기 때문인 것으로 생각되며, 재광화가 일어나는 동안 콜라겐 원섬유는 온전히 보존될 수 있다.

레진-상아질 접착의 biomimetic remineralization에 대한 연구들은 아직 개념을 증명하는 단계에 있다. 대부분의 실험에서는 치아 시편을 biomimetic analog, 칼슘, 인산 등이 포함된 배양액에 3 - 4개월 침지하여 재광화를 유도하고 있다. Biomimetic remineralization을 임상에서 사용 가능하도록 하기 위해 칼슘 이온, 수산화 이온, 인산 이온, sequestration analog, templating analog 등을 혼성층 하방으로 송달할 수 있는 방법이 연구되고 있다. 최근, Portland cement 분말을 첨가해 칼슘과 수산화 이온을 방출하는 복합 레진을 이용해 재광화를 유도한 논문이 발표되었다.⁵⁹ 그 결과는 성공적이었지만, template analog와 sequestration analog를 방출할 수 있는 방법은 좀더 연구되어야 한다.

결론

현재의 상아질 접착은 이전에 예상했던 것만큼 강도가 오래 유지되지 않는다. 그 이유 중 하나는 혼성층 내의 레진 밀도가 희박한 부위의 콜라겐 원섬유가 숙주의 MMP에 의해 분해되기 때문이다. 레진-상아질 접착의 내구성을 증가시키기 위해, 콜라겐 주변의 유리 수분을 완전히 대체하거나, MMP를 불활성화하거나 억제하는 방법이 연구되고 있다. 최근 몇 년간 이루어진 연구에서 이러한 방법들이 실제로 레진-상아질 접착의 강도와 내구성을 획기적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있다. 이러한 여러 방법들을 각각의 단점을 상쇄시키고 임상에 적용할 수 있도록 하나의 치료 전략으로 융합시킬 수 있다면 상아질 접착의 한계를 극복할 수 있을 것이다.

References

1. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. *In vivo* degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res* 2000;79:1385-1391.
2. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, Pashley DH. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, *in vivo*. *J Dent Res* 1999;78:906-911.
3. Takahashi A, Inoue S, Kawamoto C, Ominato R, Tanaka T, Sato Y, Pereira PN, Sano H. *In vivo* long-term durability of the bond to dentin using two adhesive systems. *J Adhes Dent* 2002;4:151-159.
4. De Munck J, van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;82:136-140.
5. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;66:324-330.
6. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res* 2002;59:46-55.
7. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent* 1995;20:18-25.
8. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
9. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
10. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Breschi L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A* 2009;88:697-703.
11. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45:757-765.
12. Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res* 2001;15:55-58.
13. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77:1622-1629.
14. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction *in vivo*: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res* 1995;30:23-33.
15. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216-221.
16. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006;114:160-166.
17. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006;27:4470-4476.
18. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res* 2005;84:741-746.
19. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res* 2002;59:46-55.
20. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent* 2005;18:315-319.
21. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Aust Endod J* 2009;35:131-139.
22. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni

- A, Breschi L, Carvalho RM, Tjäderhane L, Looney S, Wimmer C, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater* 2010;26:771-778.
23. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529-533.
24. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res* 2010;89:1499-1504.
25. Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent* 2010;12:27-31.
26. Cadenaro M, Pashley DH, Marchesi G, Carrilho M, Antonioli F, Mazzoni A, Tay FR, Di Lenarda R, Breschi L. Influence of chlorhexidine on the degree of conversion and E-modulus of experimental adhesive blends. *Dent Mater* 2009;25:1269-1274.
27. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater* 2008;24:1391-1399.
28. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Visintini E, Cadenaro M, Tay FR, De Stefano Dorigo E, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010;26:571-578.
29. Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;91:419-424.
30. Matchett MD, MacKinnon SL, Sweeney MI, Gottschall-Pass KT, Hurta RA. Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells. *Biochem Cell Biol* 2005;83:637-643.
31. Busenlehner LS, Armstrong RN. Insights into enzyme structure and dynamics elucidated by amide H/D exchange mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys* 2005;433:34-46.
32. Sela-Passwell N, Rosenblum G, Shoham T, Sagi I. Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:29-38.
33. O'Farrell TJ, Guo R, Hasegawa H, Pourmotabbed T. Matrix metalloproteinase-1 takes advantage of the induced fit mechanism to cleave the triple-helical type I collagen molecule. *Biochemistry* 2006;45:15411-15418.
34. Lauer-Fields JL, Chalmers MJ, Busby SA, Minond D, Griffin PR, Fields GB. Identification of specific hemopexin-like domain residues that facilitate matrix metalloproteinase collagenolytic activity. *J Biol Chem* 2009;284:24017-24024.
35. Calero P, Jorge-Herrero E, Turray J, Olmo N, López de Silanes I, Lizarbe MA, Maestro MM, Arenaz B, Castillo-Olivares JL. Gelatinases in soft tissue biomaterials. Analysis of different crosslinking agents. *Biomaterials* 2002;23:3473-3478.
36. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90:373-380.
37. Chiaraputt S, Mai S, Huffman BP, Kapur R, Agee KA, Yiu CK, Chan DC, Harnirattisai C, Arola DD, Rueggeberg FA, Pashley DH, Tay FR. Changes in resin-infiltrated dentin stiffness after water storage. *J Dent Res* 2008;87:655-660.
38. Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. *J Dent Res* 2003;82:957-961.
39. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, Tay KC. Bonding BisGMA to dentin—a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res* 2007;86:1034-1039.
40. Sauro S, Watson TF, Mannocci F, Mitake K, Huffman BP, Tay FR, Pashley DH. Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90:327-337.
41. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, Watson TF, Osorio R. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater* 2010;26:368-379.
42. Sadek FT, Pashley DH, Ferrari M, Tay FR. Tubular occlusion optimizes bonding of hydrophobic resins to dentin. *J Dent Res* 2007;86:524-528.
43. Osorio E, Toledano M, Aguilera FS, Tay FR, Osorio R. Ethanol wet bonding technique sensitivity assessed by AFM. *J Dent Res* 2010;89:1264-1269.
44. Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, Pashley DH. Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res* 2006;85:1016-1021.
45. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 2006;22:973-980.
46. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res* 2010;89:1499-1504.
47. Lees S, Page EA. A study of some properties of mineralized turkey leg tendon. *Connect Tissue Res* 1992; 28:263-287.
48. Tororian D, Lim JE, Price PA. The size exclusion

- characteristics of type I collagen: implications for the role of noncollagenous bone constituents in mineralization. *J Biol Chem* 2007;282:22437-22447.
49. Chesnick IE, Mason JT, Giuseppetti AA, Eidelman N, Potter K. Magnetic resonance microscopy of collagen mineralization. *Biophys J* 2008;95:2017-2026.
 50. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res* 2009;88:719-724.
 51. Gu LS, Huffman BP, Arola DD, Kim YK, Mai S, Elsalanty ME, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Changes in stiffness of resin-infiltrated demineralized dentin after remineralization by a bottom-up biomimetic approach. *Acta Biomater* 2010;6:1453-1461.
 52. George A, Veis A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem Rev* 2008;108:4670-4693.
 53. Wong TS, Brough B, Ho CM. Creation of functional micro/nano systems through top-down and bottom-up approaches. *Mol Cell Biomech* 2009;6:1-55.
 54. Girija EK, Yokogawa Y, Nagata F. Apatite formation on collagen fibrils in the presence of polyacrylic acid. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:593-599.
 55. Gajjaraman S, He G, Narayanan K, George A. Biological assemblies provide novel templates for the synthesis of hierarchical structures and facilitate cell adhesion. *Adv Funct Mater* 2008;18:3972-3980.
 56. Mai S, Kim YK, Kim J, Yiu CK, Ling J, Pashley DH, Tay FR. *In vitro* remineralization of severely compromised bonded dentin. *J Dent Res* 2010;89:405-410.
 57. Kim J, Vaughn RM, Gu L, Rockman RA, Arola DD, Schafer TE, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Imperfect hybrid layers created by an aggressive one-step self-etch adhesive in primary dentin are amendable to biomimetic remineralization *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:1225-1234.
 58. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Tay FR, Pashley DH. The inhibitory effect of polyvinylphosphonic acid on functional matrix metalloproteinase activities in human demineralized dentin. *Acta Biomater* 2010;6:4136-4142.
 59. Kim YK, Gu LS, Bryan TE, Kim JR, Chen L, Liu Y, Yoon JC, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. Mineralisation of reconstituted collagen using polyvinylphosphonic acid/polyacrylic acid templating matrix protein analogues in the presence of calcium, phosphate and hydroxyl ions. *Biomaterials* 2010;31:6618-6627.