

Nuclear Factor I-C 결손 생쥐에서 상아모세포의 형태학적 특징

고승백 · 이창섭 · 이난영 · 이상호 · 김흥중* · 박주철**

조선대학교 치과대학 소아치과학교실, *구강해부학교실, **구강조직학교실, 구강생물학 연구소

국문초록

NFI-C K/O 생쥐에서는 상아모세포의 분화과정에 이상이 초래되어 상아질 형성에 이상이 생기고 치근 형성이 불완전하게 이루어지는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 명확한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 상아모세포가 분화하여 정상적으로 상아질을 형성하기 위하여 핵과 세포질이 극성을 띠고 잘 조직화되어야 하며, 이 과정에는 다양한 세포사이 결합장치들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 NFI-C K/O 생쥐에서 상아질 형성에 이상이 생기는 것이 상아모세포의 형태학적 변화와 세포사이 결합장치들이 기능을 하지 못한 결과에서 기인한 것인지 알아보기 위하여, NFI-C K/O 생쥐에서 발생한 비정상적인 상아모세포들을 광학 및 투과 전자현미경을 이용하여 형태학적으로 관찰하고, ZO-1과 occludin의 발현을 면역조직화학적으로 관찰하여 세포사이 결합장치들의 분포를 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 광학현미경 소견에서 NFI-C K/O 생쥐의 전치부 상아모세포는 세포 극성이 상실되고, 여러 층으로 배열되어 있었으며 상아질에 많은 세포들이 함입된 것과 같은 비정상적인 상아질의 소견을 나타냈다. 반면에 NFI-C K/O 생쥐의 구치부 상아모세포는 치관부에서는 잘 조직화된 소견을 보였으나 치근 형성 부위에서는 세포 배열이 불규칙해지고 세포 극성이 상실되었다.
2. 투과 전자현미경 소견에서 NFI-C K/O 생쥐 전치부의 비정상적인 상아모세포는 등근 형태로 세포 사이 간격이 넓으며 폐쇄연접과 같은 세포사이 결합장치들이 전혀 관찰되지 않았다.
3. ZO-1의 면역조직화학적 염색에서 NFI-C K/O 생쥐의 전치부 법랑모세포의 근위부와 원위부에서 ZO-1이 강하게 발현되었으나 비정상적인 상아모세포에서는 ZO-1의 발현을 관찰할 수 없었다.
4. Occludin의 면역조직화학적 염색에서 정상 생쥐의 전치부 상아모세포에서는 occludin의 발현이 관찰되었으나 NFI-C K/O 생쥐의 비정상적인 상아모세포에서는 occludin의 발현이 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 NFI-C의 결손은 상아모세포의 분화 이상을 초래하고 비정상적으로 상아질을 형성하는 과정에 세포사이 결합장치의 상실과 같은 형태학적인 변화의 중요한 요소로 작용하는 것으로 생각된다.

주요어 : NFI-C, 상아모세포 분화, 치근 형성, ZO-1, Occludin

I. 서 론

치아의 형성은 치성상피와 외배엽성 간엽세포 사이의 상피-간엽 상호작용을 통해 조절되는 복잡한 과정이다¹⁾. 치아발생에 대한 연구는 세포 및 분자 생물학적 수준까지 많이 진행되어 치아발생 초기에는 BMP, FGF, Msx1, Pax9 및 Cbfa1 등의 여러 유전자들이 관여하는 것으로 알려지고 있으며, 그들의 신호 전달경로들도 밝혀지고 있다²⁻⁶⁾. 치아의 초기 발생과는 대조적

교신저자 : 박 주 철

광주광역시 동구 서석동 375번지

조선대학교 치과대학

Tel: 062-230-6874

E-mail: jcapark@chosun.ac.kr

* 이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음. (KRF-2005-202-E00148)

으로 후기 발생, 즉 치근의 발생에 관여하는 인자들에 대한 연구는 cadherin 같은 부착단백질과 osteocalcin, osteonectin 및 dentin sialoprotein 등과 같은 비교원성 단백질과 관련된 연구를 제외하고는 아직까지 알려진 것이 별로 없다^{7,8)}. 치근, 특히 치근 상아질 발생기전의 이해는 치주조직의 재생뿐만 아니라 의도적 치아 재이식 등의 임상적 적용에 중요하기 때문에 치근 상아질 발생에 대한 연구는 기초치의학 뿐 아니라 임상적으로도 매우 중요하다고 할 수 있다.

상아질을 형성하는 상아모세포는 외배엽성 간엽세포로부터 분화하는데 이 과정에서 범람모세포 전구세포의 존재가 필수적이다⁹⁾. 외배엽성 간엽세포가 상아모세포 전구세포로 분화하면 세포가 길어지고, 세포가 극성을 띠며 따라 핵이 기저부에 위치하며, 골지체가 핵 위에 위치하고, 조면내형질세망이 핵에서 먼 세포의 가장자리 쪽에 위치하게 된다. 상아모세포는 제 I형, 제 II형 교원질과 같은 유기기질과 당단백 그리고 dentin sialophosphoprotein(DSPP) 등을 합성 분비한다¹⁰⁾. 상아질의 기질이 침착됨에 따라 상아모세포가 세포질 돌기들을 원심 쪽으로 내어 상아세관에 묻히게 되고, 결과적으로 상아모세포는 치수 가장자리 상아질의 내면에 위치해서 상아질을 유지하게 된다¹¹⁾. 그러나 이러한 상아모세포의 분화과정에 대한 분자생물학적 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

Nuclear factor I(NFI) family는 시험관에서 adenovirus의 DNA 복제에 필요한 단백질로 처음 발견되었다. NFI는 포유류에서 NFI-A, -B, -C와 -X의 4종류가 존재하며 많은 세포의 유전자 발현에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁴⁾. 대표적으로 NFI-A 유전자가 없으면 뇌의 발생에 이상이 생기며, NFI-B가 상실되면 뇌와 폐의 발생 이상이 초래된다^{15,16)}. NFI-C에 관하여 최근에 Steele-Perkins 등¹⁷⁾은 NFI-C를 knock out(K/O)하여 발육부전을 보이는 치근을 가진 절치와 정상치관을 가지나 치근이 형성되지 않은 구치를 관찰하여, NFI-C가 치아발생 과정 중에 후기, 즉 치근 형성시기에 중요한 역할을 할 것이라 하였다. 최근에 배 등¹⁸⁾은 상아모세포주인 MDPC-23 세포가 상아모세포로 분화하는 과정에서 NFI-C의 과발현과 발현억제가 상아모세포 분화에 미치는 영향을 연구하여, NFI-C가 없으면 상아모세포가 골세포의 특징 유전자인 bone sialoprotein(BSP)의 발현을 유도한다고 하였다. 이는 NFI-C에 의하여 상아모세포의 표현형이 골세포로 전환될 수 있음을 시사하는 연구 결과이다.

상아모세포와 골모세포는 여러 면에서 공통점을 가지고 있다. 그러나 상아모세포는 골모세포와 다르게 상아질-특이 유전자인 dentin sialophosphoprotein(DSPP)을 합성하며, 형태학적으로 상아모세포돌기들을 만들지만 자신이 분비한 석회화된 기질에 묻히지는 않는다. 특히 상아모세포의 세포체와 상아모세포의 돌기 사이에는 상아모세포들을 강력하게 결합시키는 부착연접 등과 같은 다양한 세포사이 결합장치들이 발달되어 있다. 그러나 골모세포는 상아모세포와 다르게 세포들이 서로 부착되어있지 않고 떨어져 있어서 세포들 사이에서 세포사이 결

합장치는 거의 관찰할 수 없다¹⁹⁾.

세포사이 결합의 대표적인 형태인 폐쇄연접(zonula occludens)과 부착연접(zonula adherens)을 구성하는 단백질은 세포와 세포 사이에 존재하여 물질의 이동을 차단하는 역할을 하는 occludin, claudin, cingulin, ZO-2, ZO-3 및 actin과 이들을 세포와 결합시키는 역할을 하는 ZO-1로 이루어져 있다^{20,21)}.

본 연구에서는 상아모세포의 분화과정에서 NFI-C의 역할을 알아보기 위하여 NFI-C K/O 생쥐에서 발생한 비정상적인 상아모세포들을 광학현미경으로 관찰하고, NFI-C가 결손된 경우 세포 극성이 상실되고 기질에 함몰되는 것과 같은 상아모세포의 분화 이상과 비정상적인 상아질을 형성하는 과정에 세포사이 결합장치의 상실이 중요한 요소로 작용하는지 알아보기 위하여, 비정상적인 상아모세포들의 세포사이 결합장치들을 투과전자현미경과 ZO-1과 occludin 항체를 이용한 면역조직화학적 방법으로 연구하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 조직표본 제작-광학현미경 관찰

생후 10일과 17일의 정상 생쥐(wild type)와 NFI-C K/O 생쥐(Dr. Gronostajski, Department of Biochemistry, School of Medicine, State University of New York at Buffalo)를 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정시킨 후 상, 하악골을 포함한 머리뼈를 적출하여 동일 고정액에서 하룻밤 동안 재고정하였다. 10% ethylene diamine tetra-acetic acid(EDTA)-1% paraformaldehyde(pH 7.4) 용액에서 2주간 탈회하고 수세, 탈수 등의 과정을 거친 다음 파라핀 포매하여 8 μm 두께로 전치부를 중심으로 시상절단하고 또한 전치부에서부터 구치부까지 전방에서 후방으로 관찰하였다. 박절한 절편은 면역조직화학적 염색을 위해 4℃에 보관하였고 일부는 통법에 따라 hematoxylin-eosin으로 염색한 후 광학현미경(Olympus BX50F-3[®], Japan)으로 관찰하였다.

2. 조직표본 제작-전자현미경 관찰

생후 10일과 17일의 정상 생쥐와 NFI-C K/O 생쥐를 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정시킨 후 2.5% glutaraldehyde(0.1 M cacodylate 완충액, pH 7.4)로 4℃에서 2시간 전고정하였다. 이를 0.1 M cacodylate 완충액(pH 7.4)에서 5분간 3회 세척하고, 1% OsO₄(0.1 M cacodylate 완충액, pH 7.4)로 4℃에서 2시간 후 고정하였다. 10% EDTA-2.5% glutaraldehyde(pH 7.4) 용액에서 2주간 탈회하고 50-100% 에틸알콜로 탈수하여 propylene oxide로 처리한 다음, epon 812로 포매하였다. 포매된 재료는 초박 절편기(LKB ultratome III, Germany)로 1 μm 박절편을 만들어

1% toluidine blue로 염색하여 광학 현미경으로 관찰 대상부위를 확인 후 70-90 nm의 초박절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 투과전자현미경(JEM-1200 EXII, Jeo, Japan)으로 관찰하였다.

3. ZO-1과 Occludin 항체를 이용한 면역조직화학적 염색

보관된 절편을 탈파라핀과 함수과정을 거친 다음에 0.6% H₂O₂가 함유된 methanol 용액에 20분간, 2% non fat milk로 20분간 처리하였다. 절편을 1-2 mg/ml 농도의 단백분해효소(Zymed Lab. Inc, CA, USA) 용액을 이용하여 37°C에서 10분간 처리한 후 1:20의 비율로 희석한 polyclonal rabbit anti-ZO-1 antibody(Zymed Lab. Inc, CA, USA)와 polyclonal rabbit anti-Occludin antibody(Zymed Lab. Inc, CA, USA)로 4°C에서 하룻밤 처리하고 PBS로 20분 동안 3회 세척하였다. 2차 항체로써 mouse anti rabbit IgG(Vector Lab, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 45분 동안 처리하고 PBS로 수세하였다. ABC reagent (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 30분 동안 반응시킨 후 수세하였다. 0.05% DAB(deaminobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색하고 절편을 수세, 탈수와 건조 후에 봉입하여 광학 현미경(Olympus BX50F-3[®], Japan)으로 관찰하였다.

III. 실험결과

1. NFI-C K/O 생쥐 치아의 광학현미경 소견

생후 10일의 정상 생쥐의 절치 횡단 표본에서 극성을 띠는 법랑모세포 하방에 형성된 법랑질에 인접하여 타원형으로 형성된 상아질과 상아질의 내면에 규칙적으로 배열된 상아모세포가 관찰되었다. 잘 형성된 치근 상아질 주위로 백아모세포와 치주인대섬유모세포를 포함하는 치주조직이 발생되고 있었다(Fig. 1A). 그러나 생후 10일의 NFI-C K/O 생쥐의 절치 횡단 표본에서는 정상적으로 형성된 법랑질 아래 일부의 정상적인 상아질을 제외하고는 치수 주위에 비정상적인 상아질이 많이 형성되어 있었다. 비정상적인 상아질에는 많은 세포들이 함입되어 있었으며, 극성을 띠지 않는 비정상적인 상아모세포가 비정상적인 상아질 내면을 따라 불규칙하게 배열되어 있었다. 또한 치근부위의 상아질이 형성되지 않은 결과로 설측면이 상아질에 의해 둘러싸이지 않고 노출되어 있었으며 치주조직의 정상적인 발생 양상도 관찰할 수 없었다(Fig. 1B).

생후 17일의 정상 생쥐의 구치 종단 표본에서 치관부에 존재하는 상아모세포들은 상아질에 직각 방향으로 배열되어 있었고, 세포는 길고 극성을 띠며 잘 조직화된 소견을 보였다. 치근부에서도 미분화된 외배엽성 간엽세포와 키가 작으나 규칙적으로 잘 조직화되어 있으며 서로 밀착되어 있는 상아모세포 전구세포들과 극성을 띠는 상아모세포들이 치근부와 치관부에서 순

서대로 관찰되었다(Fig. 2A). 생후 17일의 NFI-C K/O 생쥐의 구치 종단 표본에서는 치관의 상아질은 정상적으로 형성되었고 상아모세포들도 정상 생쥐의 상아모세포와 대체로 유사한 양상을 나타냈다. 그러나 치근 발생 부위는 상아질의 형성을 거의 관찰할 수 없었고 상아모세포 전구세포들도 세포극성이 상실되었으며 세포들이 한 층이 아닌 여러 층으로 배열되어 있었다(Fig. 2B).

2. NFI-C K/O 생쥐 상아모세포의 투과전자현미경 소견

생후 17일의 정상 생쥐 전치의 상아모세포들은 극성을 띠어 핵이 원심쪽에 위치하면서 길고 풍부한 세포질을 함유한 형태로 상아질에 직각 방향으로 배열되었다. 세포사이의 긴밀하게 결합된 형태로 잘 조직화된 소견을 보였다(Fig. 3A). 그러나 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포는 정상적인 상아모세포와는 다르게 세포들이 둥근 형태였으며 세포극성이 상실되었고, 세포들이 한 층이 아닌 여러 층으로 배열되어 있었다. 또한 많은 세포들 사이에 공간이 관찰되어 세포사이의 긴밀한 결합 양상은 볼 수 없었다(Fig. 3B). 정상 생쥐의 상아모세포들 사이에서는 다수의 세포사이 결합장치들이 관찰되었으나 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포에서는 세포사이의 결합장치들을 관찰할 수 없었다(Fig. 3C, 3D).

3. ZO-1과 Occludin 단백질의 발현

1) ZO-1 단백질의 발현

생후 10일의 정상 생쥐의 전치 종단 표본에서 활발하게 법랑질을 형성하고 있는 법랑모세포의 핵은 중간층측 근위쪽으로 위치하였고 풍부한 세포질은 원위쪽에서 관찰되었는데 ZO-1 단백질은 법랑모세포의 근위쪽과 원위쪽에서 모두 뚜렷하게 관찰되었다. 상아질을 형성하며 극성을 띠고 다양한 방향으로 절단된 상아모세포에서는 ZO-1 단백질이 전체적으로 매우 약하게 발현되었다(Fig. 4A). NFI-C K/O 생쥐의 법랑모세포에서는 ZO-1 단백질이 법랑모세포의 근위쪽과 원위쪽에서 모두 뚜렷하게 관찰된다. 반면 비정상적인 상아질 즉 골양상아질을 형성하고 있으며 상당수가 기질에 묻힌 형태로 존재하는 상아모세포에서는 ZO-1 단백질은 발현되지 않았다(Fig. 4B).

생후 17일의 구치 종단표본에서 ZO-1 단백질은 정상 생쥐와 NFI-C K/O 생쥐의 법랑모세포의 근위쪽과 원위쪽에서 뚜렷하게 관찰되었으며, 상아모세포에서는 약하게 발현되었다(Fig. 4C, 4D).

2) Occludin 단백질의 발현

생후 17일의 정상 생쥐의 전치 종단 표본에서 occludin 단백질은 법랑모세포의 중간층측 근위쪽에서 강하게 발현되었으며 상아모세포에도 뚜렷한 발현이 관찰되었다(Fig. 5A). NFI-C K/O 생쥐에서는 법랑모세포의 중간층측 근위쪽에서 occludin

단백질이 발현되었으나, 비정상적인 상아모세포에는 발현되지 않았다(Fig. 5B).

IV. 총괄 및 고안

Steele-Parkins 등¹⁷⁾의 연구에 의하면 NFI-C 유전자는 치아 발생과정에서 외배엽성 간엽세포에는 발현되지 않으나, 상아모세포 전구세포에서 발현되기 시작하여 상아모세포의 분화가 진행됨에 따라 발현이 증가한다고 하였다. NFI-C는 골모세포에서도 발현되나 골세포에서는 발현되지 않는다고 하였다. 그러나 NFI-C K/O 생쥐에서 골조직은 이상이 없이 상아모세포의 분화와 상아질 형성에만 이상이 초래된 것은 NFI-C가 상아모세포에만 선택적으로 작용함을 의미한다. 또한 NFI-C K/O 생쥐 전치와 구치에서 치관은 정상적으로 형성되나 치근은 잘 형성되지 않는다고 하였다. 본 연구에서도 생후 10일의 NFI-C K/O 생쥐의 절치 횡단 표본에서는 치관부의 일부 정상적인 상아질을 제외하고는 치수 주위에 비정상적인 상아질이 많이 형성되어 있었으며 비정상적인 상아질에는 많은 세포들이 함입되어 있었고, 치근부위의 상아질이 형성되지 않은 결과로 설측면이 상아질에 의해 둘러싸이지 않고 노출되어 있었으며, 치주조직의 정상적인 발생 양상도 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 생후 17일의 NFI-C K/O 생쥐의 구치 종단 표본에서는 치관의 상아질은 정상적으로 형성되었으나 치근 발생 부위는 상아질의 형성을 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 구치부에 비하여 전치부의 NFI-C K/O 생쥐의 이상이 뚜렷하게 나타난 것은 전치부에 비하여 구치부의 치근발생이 시기적으로 늦게 이루어지기 때문인 것으로 판단된다. 이 결과는 NFI-C 유전자가 치아의 발생과정에서 후기, 특히 치근 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

치근이 만들어지는 데에는 Hertwig 상피근초가 있어야 하고 치근 상아모세포의 분화가 필수적이다. Hertwig 상피근초가 정상적인 위치에 형성되고 치유두 세포로부터 상아모세포의 분화를 정상적으로 유도해야 비로소 치근이 정상적으로 형성된다²²⁾. 본 연구에서 NFI-C K/O 생쥐의 치근 상아모세포의 분화가 정상적으로 진행되지 못한 것이 관찰되었다. 그러나 치근 상아모세포의 분화에 중요한 역할을 하는 Hertwig 상피근초의 이상 유무는 확인하지 못하였다. 따라서 NFI-C K/O 생쥐의 치근 형성이 이루어지지 않은 원인을 규명하기 위해서 항 후 cytokeratin과 같은 상피에서 독특하게 발현되는 물질을 이용한 면역조직화학적 연구를 이용하여 NFI-C K/O 생쥐의 Hertwig 상피근초의 특성을 확인하는 연구도 필요할 것으로 생각된다.

상아모세포는 그 원위 끝단으로 기질 단백질을 분비하는 고도의 극성을 띠는 결합조직-합성 세포로써, 세포체와 세포질 돌기를 갖고 있는 키가 크고 극성을 띠는 세포로 상아전질과 상아질을 형성하고 유지한다. 골세포나 연골세포와는 달리 상아모세포는 석회화된 기질에 함입되어 있지 않고 항상 상아질의 치

수 측에 자리한다. 인접한 상아모세포들 사이에는 결합들이 관찰되는데 틈새연접(gap junction), 폐쇄연접(zonula occludens, tight junction), 부착띠(adhesion belts), 부착반점(desmosomes) 등이 그 예이다. 세포체가 돌기가 되는 면 쪽에서는 대부분 부착띠와 폐쇄연접이 섞여서 나타나는 연접복합체의 형태로 나타나고, 액틴 미세사들이 부착띠 내로 들어가는 것이 현저하며 중말그물을 형성한다²³⁻²⁵⁾. 이 연접복합체는 상피세포에서처럼 세포를 완전히 둘러싸는 띠모양으로 나타나는 것이 아니라 국소적인 형태로 나타난다. 이 결합장치들이 상아모세포가 상아질 내면을 따라서 한 층으로 배열될 수 있게 하며, 상아전질에 세포들이 함입되지 못하도록 세포들끼리 붙잡아주는 역할을 한다^{26,27)}. 또한, 이런 결합장치들이 상아전질과 상아질을 평탄한 양상으로 형성하고 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 본 연구의 투과전자현미경 관찰에서 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포는 정상 상아모세포와는 다르게 세포의 키가 작고 둥글며 세포끼리 서로 부착되어 있지 않았다(Fig. 3A, 3B). 이 세포들은 또한 세포 극성과 방향성이 상실되고 세포 덩어리가 관찰되는 등 매우 불규칙한 양상을 보였으며, 고배율 소견에서 정상 생쥐의 상아모세포들 사이에서는 다수의 세포사이 결합장치들이 관찰되었으나 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포에서는 중말그물이나 연접복합체와 같은 세포사이 결합장치들을 관찰할 수 없었다(Fig. 3C, 3D). 이 결과는 NFI-C 유전자가 결손되면 세포사이 결합장치의 형성에 이상이 초래됨을 나타낸다. 그러나 세포사이 결합장치의 형성 이상으로 인하여 비정상적인 상아모세포가 분화된 것인지 아니면 NFI-C 유전자가 결손으로 상아모세포의 표현형이 골모세포로 변한 결과로 세포사이 결합장치의 형성 이상이 초래된 것인지에 관하여는 향후 보완 연구가 필요할 것이다.

배 등¹⁸⁾은 최근에 상아모세포주인 MDPC-23 세포에 NFI-C를 과발현 또는 발현 억제시킨 후 DSPP와 BSP mRNA의 발현 확인을 통하여 상아모세포 분화과정에서 NFI-C의 역할을 규명하고자 하였다. 연구결과에 의하면 MDPC-23 세포에 NFI-C를 과발현시킨 3일 후에 DSPP mRNA의 발현이 확인되었다. 이는 정상적으로는 MDPC-23 세포가 배양 14일 후에 DSPP mRNA를 발현한다는 사실을 생각하면, NFI-C에 의해 DSPP mRNA의 발현이 촉진되었음을 나타낸다. 이 결과는 NFI-C가 상아모세포-특이 유전자인 DSPP의 전사와 상아모세포의 분화 과정에서 중요한 역할을 함을 시사한다. 또한, MDPC-23 세포에 NFI-C의 발현을 억제시킨 3일 후에는 BSP mRNA의 발현이 확인되었다. 이 결과는 NFI-C의 기능이 상실되면 MDPC-23 세포의 표현형이 상아모세포에서 골모세포로 변화될 수 있음을 시사하는 연구 결과이다. 또한, 최근에 Thyagarajan 등²⁸⁾이 TGF- β 1을 과발현시킨 transgenic mice에서 상아모세포의 세포 극성이 상실되며, 골양상아질과 유사한 상아질에 세포가 함입되고 DSPP mRNA가 발현되지 않는다고 하였다. 이는 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포의 변화와 유사한 것이다. 이 결과는 TGF- β 1을 과발현시킨 transgenic

mice와 NFI-C K/O mice에서 모두 상아모세포에서 골모세포로 세포의 특성이 변한다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구 결과에서 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포가 형태학적으로 골모세포와 유사한 특성을 나타낸다는 사실과 관련하여 NFI-C나 TGF- β 1 등의 유전자에 의하여 상아모세포가 골모세포로 변환되는 기전에 관하여는 많은 보완 연구가 필요할 것이다.

법랑모세포와 상아모세포에 존재하는 다양한 세포사이 결합장치들은 전자현미경과 freeze-fracture법을 이용하여 연구되어 왔으나 이 방법들로는 세포에 존재하는 결합장치들의 위치를 명확히 판단하는데 많은 어려움이 있었다²⁹⁾. 따라서 최근에는 세포사이 결합장치의 존재를 확인하기 위하여 결합장치를 구성하는 단백질을 면역조직화학적으로 검출하여 위치를 간접적으로 추정하는 방법이 널리 이용되고 있다³⁰⁾. 몇 가지 세포내 막단백질들이 폐쇄연접의 세포질 부분을 구성하는데 그중에서도 가장 중요한 역할을 하는 요소가 225 kDa의 막단백질인 ZO-1이다³¹⁾. 폐쇄연접의 두 세포사이의 막통과 단백질로는 occludin과 claudin이 알려져 있다³²⁻³⁴⁾.

법랑모세포와 상아모세포의 연접복합체의 구조는 상당한 차이가 있다. 법랑모세포에는 벨트형태(belt-like, zonula)의 결합장치가 존재하는 반면에 상아모세포에는 반점 형태(macula)의 결합장치가 존재하는 것으로 알려져 있다^{35,36)}. 폐쇄연접은 일반적으로 세포의 두 가지 기능, 즉 세포가 극성을 띠게 하고 이를 유지하는 기능과 세포사이로 물질이 통과하지 못하게 차단하는 기능을 한다³⁷⁻³⁹⁾. 법랑모세포에는 두 부위에 폐쇄연접이 존재한다. 하나는 중간층 세포에 인접한 법랑모세포의 근위부에 존재하는 것이고 또 다른 하나는 법랑질을 분비하는 부위인 원위부의 것이다. 이와 비교하여 상아모세포는 상아질을 분비하는 쪽인 원위부에만 폐쇄연접이 존재한다⁴⁰⁾. 법랑모세포가 분화할 때 ZO-1 단백질은 법랑모세포의 원위부에서 발현되기 시작하여 시간 경과에 따라 근위부에서도 발현된다. 반면에 occludin은 초기법랑모세포에서는 근위부와 원위부에 모두 발현되지만 분비-성숙법랑모세포에서는 원위부에만 국한되어 발현된다⁴¹⁾. 이는 법랑모세포가 분화하여 법랑질을 분비하는 시기에 세포들의 극성이 높은 점을 생각할 때 근위부의 폐쇄연접은 세포사이의 차단막 기능과 관련이 깊으며, 원위부의 폐쇄연접은 극성의 형성과 유지에 깊은 관련이 있는 것으로 보인다. 또한, 세포의 극성과 주로 관련되는 단백질은 ZO-1이고 폐쇄연접의 투과장막을 형성하는 가장 중요한 단백질은 occludin으로 생각할 수 있다⁴²⁾.

본 연구에서 생후 10일의 NFI-C K/O 생쥐에서도 법랑모세포에서는 ZO-1 단백질이 법랑모세포의 근위쪽과 원위쪽에서 모두 뚜렷하게 관찰되었으나, 비정상적인 상아모세포에서는 ZO-1 단백질이 발현되지 않았다(Fig. 4A, 4B). 이는 정상적인 상아모세포가 NFI-C K/O의 결과로 세포사이 결합장치의 형성이 이루어지지 않았음을 나타낸다. 또한, 생후 17일의 구치 종단표본에서 ZO-1 단백질은 정상 생쥐와 NFI-C K/O 생쥐의 치관부 상아모세포에서 모두 약하게 발현되었다(Fig. 4C,

4D). 이 결과는 NFI-C가 치아의 후기발생과정 즉 치근의 형성에 주로 관여하기 때문에 구치 치관부의 상아모세포는 세포사이 결합장치가 정상적으로 형성되었음을 의미한다. Occludin 단백질은 생후 17일의 정상 생쥐의 전치 종단 표본에서 상아모세포에서 뚜렷히 발현되었으나, NFI-C K/O 생쥐에서의 비정상적인 상아모세포에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 5A, 5B). 이는 전치부의 상아모세포가 NFI-C K/O에 의하여 그 특성이 변화하였음을 나타낸다. 이와 비교하여 생후 10일의 정상 상아모세포에서 ZO-1가 아주 약하게 발현된 결과를 보였는데, 이는 상아모세포의 원위부에 국한하여 존재하는 ZO-1의 양이 면역조직화학적으로 검출하기 어려운 정도의 소량이기 때문에 나타난 결과인 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 NFI-C는 상아모세포의 형태와 표현형에 영향을 미치는 상아모세포의 분화와 상아질의 형성 과정을 조절하는 중요한 요소이지만, 이에 관련 되는 기전과 현상을 명확히 하기 위해서는 NFI-C와 치근형성 유전자와의 상호관계, NFI-C 전사인자 연구 및 NFI-C를 조절하는 인자 등에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결 론

NFI-C K/O 생쥐에서는 상아모세포의 분화과정에 이상이 초래되어 결과적으로 상아질 형성에 이상이 생기고 치근 형성이 불완전하게 이루어지는 것으로 알려져 있다. 그러나 이에 대한 명확한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 상아모세포가 분화하여 정상적으로 상아질을 형성하는 데에는 핵과 세포질이 극성을 띠고 잘 조직화되어야 하며, 이 과정에는 다양한 세포사이 결합장치들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 NFI-C K/O 생쥐에서 상아질 형성에 이상이 생기는 것이 상아모세포의 형태학적 변화와 세포사이 결합장치들이 기능을 하지 못한 결과에서 기인한 것인지 알아보기 위하여, NFI-C K/O 생쥐에서 발생한 비정상적인 상아모세포들을 광학 및 투과 전자현미경을 이용하여 형태학적으로 관찰하고, Zo-1과 occludin의 발현을 면역조직화학적으로 관찰하여 세포사이 결합장치들의 분포를 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 광학현미경 소견에서 NFI-C K/O 생쥐의 전치부 상아모세포는 세포 극성이 상실되고, 여러 층으로 배열되어 있었으며 상아질에 많은 세포들이 함입된 것과 같은 비정상적인 상아질의 소견을 나타냈다. 반면에 NFI-C K/O 생쥐의 구치부 상아모세포는 치관부에서는 잘 조직화된 소견을 보였으나 치근 형성 부위에서는 세포 배열이 불규칙해지고 세포 극성이 상실되었다.
2. 투과 전자현미경 소견에서 NFI-C K/O 생쥐 전치부의 비정상적인 상아모세포는 등근 형태로 세포 사이 간격이 넓으며 폐쇄연접과 같은 세포사이 결합장치들이 전혀 관찰되지 않았다.

3. ZO-1의 면역조직화학적 염색에서 NFI-C K/O 생쥐의 전치부 법랑모세포의 근위부와 원위부에서 ZO-1이 강하게 발현되었으나 비정상적인 상아모세포에서는 ZO-1의 발현을 관찰할 수 없었다.
4. Occludin의 면역조직화학적 염색에서 정상 생쥐의 전치부 상아모세포에서는 occludin의 발현이 관찰되었으나 NFI-C K/O 생쥐의 비정상적인 상아모세포에서는 occludin의 발현이 관찰되지 않았다.
이상의 결과를 종합하여 볼 때 NFI-C의 결손은 상아모세포의 분화 이상을 초래하고 비정상적으로 상아질을 형성하는 과정에 세포사이 결합장치의 상실과 같은 형태학적인 변화의 중요한 요소로 작용하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Mina M, Kollar EJ : The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol*, 32:123-127, 1987.
2. Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, et al. : Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev*, 101:255-258, 2001.
3. D' Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, et al. : Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development*, 126:2911-2920, 1999.
4. Jiang H, Sodek J, Karsenty G, et al. : Expression of core binding factor Osf2/Cbfa-1 and bone sialoprotein in tooth development. *Mech Dev*, 81:169-173, 1999.
5. Peter H, Balling R : Teeth: where and how to make them. *Tooth Development*, 15:59-65, 1999.
6. Young CS, Terada S, Vacanti JP, et al. : Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*, 81:695-700, 2002.
7. Obara N, Suzuki Y, Nagai Y, et al. : Immunofluorescence detection of cadherins in mouse tooth germs during root development. *Arch Oral Biol*, 44:415-421, 1999.
8. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, et al. : Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone*, 30:377-385, 2002.
9. Avery JK : Oral development and histology. 3rd ed, Thieme, 72-152, 2001.
10. Garant PR : The organization of microtubules within rat odontoblast processes revealed by perfusion fixation with glutaraldehyde. *Arch Oral Biol*, 17:1047-1058, 1972.
11. Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, et al. : Comparative analysis of TGF betas, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 38:405-420, 1994.
12. Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM, et al. : Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev Dyn*, 208:313-325, 1998.
13. Chaudhry AZ, Vitullo AD, Gronostajski RM, et al. : Nuclear factor I-mediated repression of the mouse mammary tumor virus promoter is abrogated by the coactivators p300/CBP and SRC-1. *J Biol Chem*, 274:7072-7081, 1999.
14. Chaudhry AZ, Vitullo AD, Gronostajski RM, et al. : Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters. *J Biol Chem*, 273:18538-18546, 1999.
15. Gronostajski RM, Knox J, Berry D, et al. : Stimulation of transcription in vitro by binding sites for nuclear factor I. *Nucleic Acids Res*, 16:2087-2098, 1988.
16. Ling G, Hauer CR, Gronostajski RM, et al. : Transcriptional regulation of rat CYP2A3 by nuclear factor 1: identification of a novel NFI-A isoform, and evidence for tissue-selective interaction of NFI with the CYP2A3 promoter in vivo. *J Biol Chem*, 279:27888-27895, 2004.
17. Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, et al. : Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Mol Cell Biol*, 23:1075-1084, 2003.
18. 배현숙, 김홍중, 정문진 등 : 상아모세포 분화과정에서 nuclear factor I-C의 역할. *대한구강병리학회지*, 29:83-82, 2005.
19. Garant PR : Oral cells and tissues. 1st ed., Quintessence books, p.1-3, 2003.
20. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. : Molecular biology of the cell, 4th ed., Garland Science, Newyork, p.1065-1089, 2002.
21. Cordenonsi M, D' Atri F, Hammer E, et al. :

- Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*, 147:1569-1582, 1999.
22. Talic NF, Evans CA, Daniel JC, et al. : Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 123:527-533, 2003.
 23. Nanci A : Tencaté's oral histology development, structure, and function. 6th ed., Mosby, 145-239, 2003.
 24. Garant PR, Cho MI : Recent studies of odontoblast structure and function: The secretory processes examined with a proline analog and the polyene antibiotic filipin. *INSERM Symposia*, 125:143-158, 1984.
 25. Holland GR : The extent of the odontoblast process in the cat. *J Anat*, 121:133-149, 1976.
 26. Sasaki T, Garant PR : Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec*, 245:235-249, 1996.
 27. Linde A, Goldberg M : Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4:679-728, 1993.
 28. Thyagarajan T, Sreenath T, Cho A, et al. : Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor- β 1 in teeth. *J Biol Chem*, 276:11016-11020, 2001.
 29. Calle A : Intercellular junctions between human odontoblasts. A freeze-fracture study after demineralization. *Acta Anat*, 122:138-144, 1985.
 30. Seki K, Komuro T : Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine. *Cell Tissue Res*, 306:417-422, 2001.
 31. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, et al. : Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 103:755-766, 1986.
 32. Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. : Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123:1777-1788, 1993.
 33. Furuse M, Fujita K, Hiigari T, et al. : Claudin-1 and 2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141:1539-1550, 1998.
 34. Kubota K, Furuse M, Sasaki H, et al. : Ca^{2+} -independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr Biol*, 9:1035-1038, 1999.
 35. Sasaki T : Cell biology of tooth enamel formation: functional electron microscopic monographs. Basel: Karger, 1990.
 36. Arana-Chavez VE, Katchburian E : Development of tight junctions between odontoblasts in early dentinogenesis as revealed by freeze-fracture. *Anat Rec*, 248:332-338, 1997.
 37. Anderson JM : Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci*, 16:126-130, 2001.
 38. Gumbiner B : Generation and maintenance of epithelial cell polarity. *Curr Opin Cell Biol*, 2:881-887, 1990.
 39. Arana-Chavez VE, Katchburian E : Freeze-fracture studies of the distal plasma membrane of rat odontoblasts during their differentiation and polarization. *Eur J Oral Sci*, 106:132-136, 1998.
 40. Sasaki T, Higashi S, Tachikawa T, et al. : Formation of tight junctions in differentiating and secretory ameloblasts of rat molar tooth germs. *Arch Oral Biol*, 27:1059-1068, 1982.
 41. Sasaki T, Segawa K, Tachiguchi R, et al. : Formation of tight and gap junctions in the inner enamel epithelium and preameloblasts in human fetal tooth germs. *Acta Anat*, 121:223-229, 1985.
 42. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR : Protein interactions at tight junction. *J Biol Chem*, 274:35179-35185, 1999.

사진부도 설명

- Fig. 1. Light micrographs showing cross sections of incisors from P10 wild type (1A) and knockout (1B) mice. A: A normal incisor shows a circular dentin (D) and odontoblasts (O) that line the inner surface of the dentin. The pulp chamber (P) is filled with pulp fibroblasts. B: A mutant incisor shows an open area as a result of failure of dentin formation by abnormal odontoblasts. Note thick osteodentin (OD) that contains numerous trapped cells and abnormal odontoblasts lining the inner surface of osteodentin. Abnormal odontoblasts demonstrate totally different morphology. They have a round shape (arrowheads), and many cells embedded in osteodentin. Note their morphology that resembles osteoblasts and osteocytes. Am: ameloblasts, E: Enamel. Scale bars = 200 μ m.
- Fig. 2. Light micrographs showing longitudinal sections of molars from P17 wild type (2A) and knockout (2B) mice. A: Fully differentiated odontoblasts (O) are elongated and extremely well organized as a sheet of odontoblasts located perpendicular to the dentin (D) surface. B: A mutant molar shows an preodontoblasts and odontoblasts demonstrating different morphology. Odontoblasts shows well organized and elongated in coronal dentin area. However, preodontoblasts shows disorganized pattern especially in root dentin area. Am: ameloblasts, E: enamel, P: pulp. Scale bars = 200 μ m.
- Fig. 3. Electron micrographs showing odontoblasts in longitudinal sections of mandibular incisors from P17 wild type (2A and C) and knockout mice (3B and D). A: Odontoblasts in wild type incisor are elongated in height, well organized and tightly arranged (Uranyl acetate and Lead citrate stain, $\times 1,000$). B: Abnormal odontoblasts of mutant incisor demonstrate totally different morphology. They have a round shape, and not tightly arranged (Uranyl acetate and Lead citrate stain, $\times 1,000$). C: There were many intercellular junctions (arrows) such as tight junctions between odontoblasts of the wild type mouse (Uranyl acetate and Lead citrate stain, $\times 7,000$). D: Neither intercellular junctions nor terminal webs are observed in odontoblasts of knock out mouse (Uranyl acetate and Lead citrate stain, $\times 7,000$).
- Fig. 4. Immunohistochemical localization of ZO-1 in longitudinal sections of mandibular incisors from P10 wild type (4A) and knockout mice (4B), and molars from P17 wild type (4C) and knockout mice (4D). A: A normal incisor shows spots and lines positively reactive of ZO-1 at the proximal (arrows) and distal ends (arrowheads) of the secreting ameloblasts (Am). Weak immunoreactivity is also observed in the secreting odontoblasts (O). B: A mutant incisor shows labeling for ZO-1 at the proximal (arrows) and distal ends (arrowheads) of the ameloblasts. Staining for ZO-1 is not observed in the abnormal odontoblasts. C and D: Normal and mutant molars shows positive reactivity for ZO-1 in the proximal (arrows) and distal ends (arrowheads) of the ameloblasts, and also weakly in odontoblasts. E: enamel, P: pulp. Scale bars = 200 μ m.
- Fig. 5. Immunohistochemical localization of occludin in longitudinal sections of mandibular incisors from P17 wild type (5A) and knockout mice (5B). A: A normal incisor shows labelling for occludin at the proximal (arrows) ends of ameloblasts (Am) and also in odontoblasts (O). B: A mutant incisor shows immunolabeling for occludin at the proximal (arrows) ends of ameloblasts. However, staining for occludin is not observed in the abnormal odontoblasts. OD: osteodentin, P: pulp. Scale bars = 200 μ m.

사진부도 ①

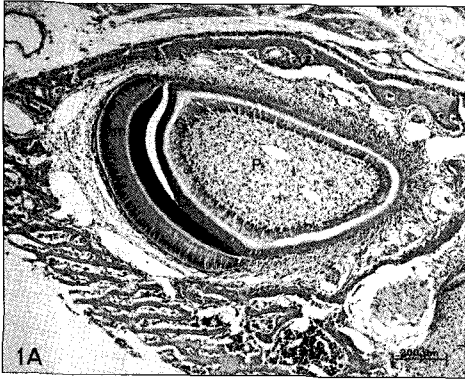


Fig. 1A

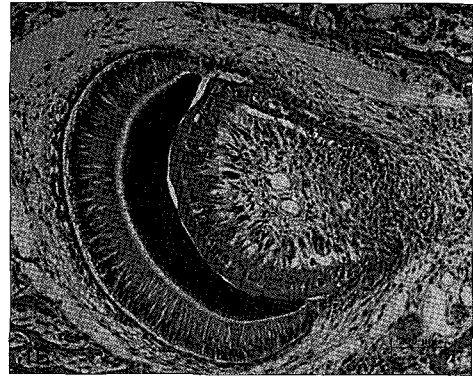


Fig. 1B

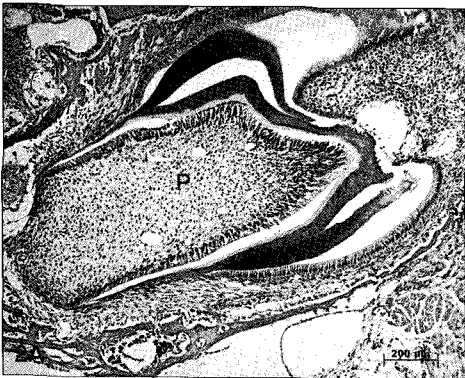


Fig. 2A

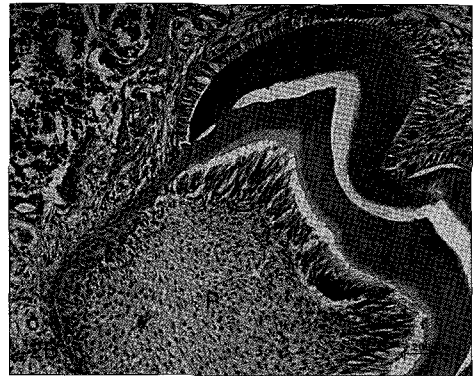


Fig. 2B

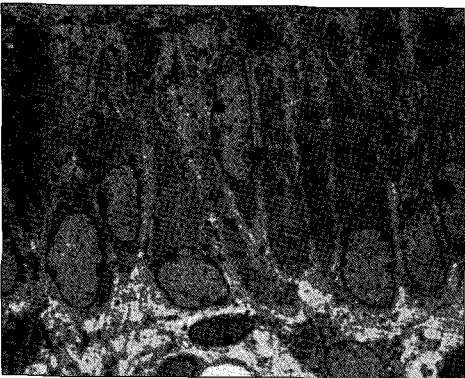


Fig. 3A



Fig. 3B

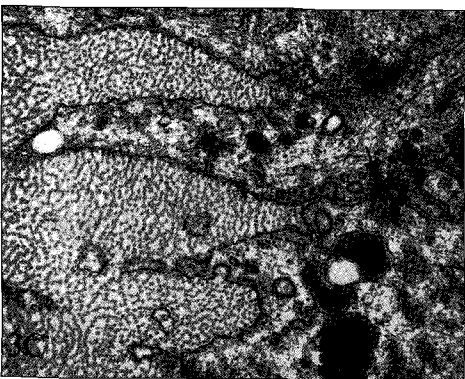


Fig. 3C

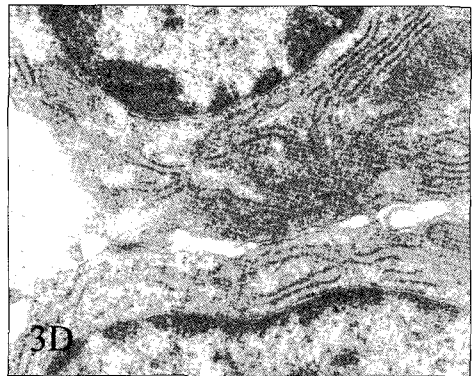


Fig. 3D

사진부도 ②

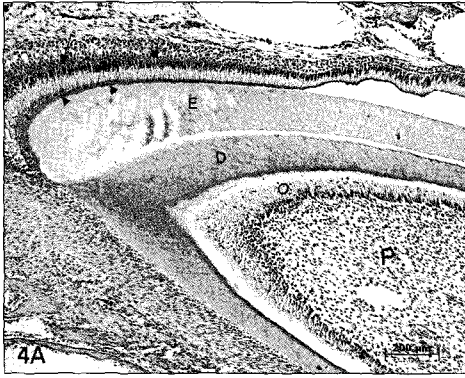


Fig. 4A

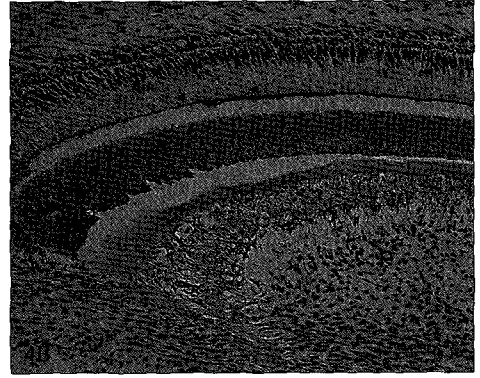


Fig. 4B

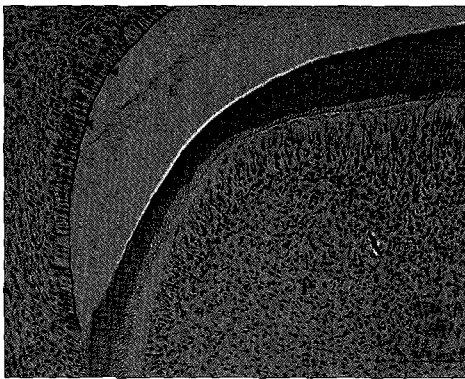


Fig. 4C

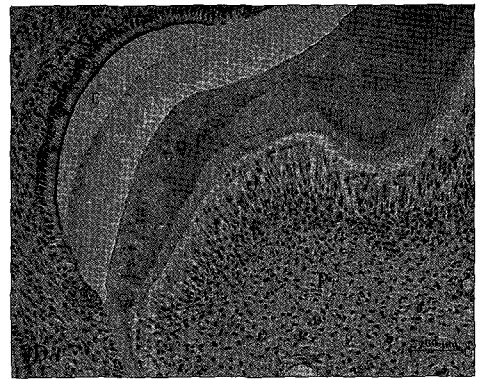


Fig. 4D

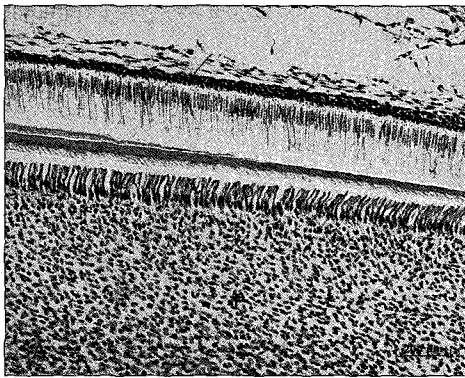


Fig. 5A

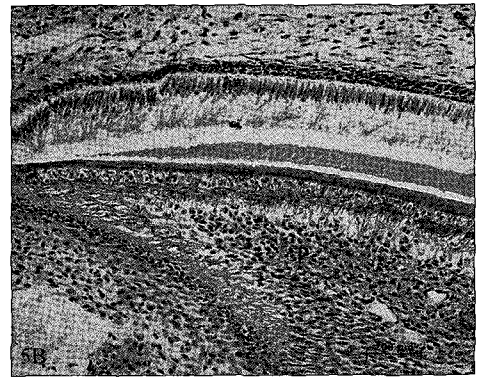


Fig. 5B

Abstract

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ODONTOBLAST IN NFI-C KNOCK/OUT MICE

Seung-Bak Ko, Chang-Seop Lee, Nan-Young Lee, Sang-Ho Lee,
Heung-Joong Kim*, Joo-Cheol Park**

*Department of Pediatric Dentistry, *Oral Anatomy, **Oral Histology,
and Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun University*

NFI-C null mice demonstrated aberrant odontoblast differentiation and thus abnormal dentin formation while other tissues/organs in the body, including ameloblasts, appear to be unaffected and normal. However, little is known about the mechanism of NFI-C function in odontoblast differentiation and dentin formation.

Odontoblasts are tall, highly polarized cells that are responsible for formation and maintenance of the pre-dentin and dentin. An indication of their polarity is the acquisition of specialized intercellular junctions. As preodontoblasts differentiate into odontoblasts, they are joined and attached at the apical end by well developed terminal webs of cytoskeletal actins, and associated tight as well as adherent junctions.

In this study, in order to investigate if disruption of the NFI-C gene interferes with formation of a specific or other structural proteins of the intercellular junctions, we examined morphological characteristic of the aberrant odontoblast in NFI-C null mice using light and electron microscope. In addition, we determined the expression of major structural proteins of intercellular junctions, ZO-1 and occludin, during the differentiation of odontoblasts using immunohistochemistry.

The results were as follows:

1. In light microscopy, abnormal odontoblasts of incisors of the NFI-C null mice were round in shape, lost their polarity, and trapped in osteodentin-like mineralized tissue. Mutant molars have relatively normal crowns, but short and abnormal differentiating odontoblasts in root formation area.
2. Electron microscopy of abnormal odontoblasts revealed the dissociation of the round osteoblast-like cells, the loss of their cellular polarity, and the absence of an intercellular junctional complex known as the tight junctions.
3. A mutant incisor showed labeling for ZO-1 at the proximal and distal ends of secreting ameloblasts, while staining for ZO-1 was not observed in the abnormal odontoblasts.
4. A normal incisor showed immunoreactivity for occludin in the differentiating odontoblasts. However, staining for occludin was not observed in the abnormal odontoblasts of mutant incisor.

These results suggest that NFI-C gene causes dissociation of odontoblast and thus aberrant odontoblast differentiation and abnormal dentin formation by interfering with the formation of intercellular junctions.

Key words : NFI-C, Odontoblast differentiation, Root formation, ZO-1, Occludin