

## Stimulatory Effect of N-acetylcysteine on Odontoblastic Differentiation

Ji Hae Jun, Hye-Lim Lee, Jeong-Hwa Baek\*

Department of Cell & Developmental Biology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University

(Received November 28, 2008 ; Revised December 4, 2008 ; Accepted December 8, 2008)

Reparative dentine formation requires newly differentiated odontoblast-like cells. Therefore, identification of the molecule that stimulates the odontogenic differentiation of precursor cells in the tooth pulp will be helpful for the development of strategies to repair damaged pulp. In this study, we examined the effect of N-acetylcysteine (NAC) on the odontogenic differentiation of MDPC-23 cells, a mouse odontoblast-like cell line derived from dental papilla, and primary cultured rat dental papilla cells (RDPCs). NAC (1-30 mM) suppressed production of reactive oxygen species in MDPC-23 cells in a dose-dependent manner. Although 5 to 20 mM NAC did not alter MDPC-23 cell proliferation, 1 or 30 mM NAC significantly inhibited it. NAC enhanced mineralized nodule formation and the expression of several odontoblast differentiation-associated genes in both RDPCs and MDPC-23. This NAC stimulatory effect was significant, even at concentrations lower than 1 mM. However, NAC did not stimulate expression of bone morphogenetic protein-2, -4, or -7, which are known to enhance odontogenic differentiation. Since reactive oxygen species are also involved in the pulp toxicity of resin-based restorative materials, these results suggest that NAC may be a promising candidate for supplementation of dental restorative materials in order to enhance reparative dentine formation.

**Key Words :** N-acetylcysteine, Odontoblast, Differentiation

### 서 론

상아모세포는 신경능선에서 유래된 외배엽성 증배엽 세포(ectomesenchymal cell)로부터 분화되며 치아발생과정

중 치근 발생이 완성될 때까지 일차 상아질을 생성한다(Ruch et al., 1995). 한번 분화된 상아모세포는 치아의 수명이 지속되는 동안 더 이상의 세포분열이 없이 유지되며, 평생에 걸쳐 외부 자극에 반응하면서 이차상아질을 만들게 되므로 치수강의 크기가 점점 작아지게 된다. 그러나 이러한 생리적 상아질 생성과정 외에 치아우식 또는 치아의 기계적 손상에 대한 반응으로 치수강에서 두 종류의 삼차상아질 생성이 일어날 수 있다. 치아 우식의 정도가 경미한 경우에는 치아와동 형성 및 수복과정에서 치수에 대한 직접적 손상이 없고 상아모세포의 생존에 큰 해를 끼치지 않으므로 기존에 존재하는 상아모세포에 의한 세포외기질 분비 및 석회화를 통해 반응상아질(reactionary dentine)을 형성하게 된다(Smith et al., 1995). 그러나 치아우식이 상당히 진행되면 치아 수복과정에서 치수가 직접 노출되지 않아도 와동 주변 상아모세포의 세포사가 일어날 수 있으며 치아수복과정 중에 치수가 노출된 경우에는 와동주변 상아모세포층에 손상을 주게 된다. 치수강에 염증이 심하지 않고 감염되지 않았다면 소실된 상아모세포를 대체하기 위해 상처 치유과정 중 치수강에 존재하는 전구세포로부터 상아모세포-유사세포로 분화가 이루어지면서 수복상아질(reparative dentine)을 형성할 수 있다(Tziafas, 1995). 이렇게 만들어진 수복상아질은 치수를 물리화학적 및 세균 자극으로부터 보호하는 데 있어 어떤 수복재료보다도 더 유용한 방어막이므로, 치아수복과정에서 수복상아질의 형성을 유도하는 효과적인 물질을 찾기 위한 연구가 오랫동안 진행되어 왔다(Tziafas, 2004). 수복상아질의 형성을 촉진하고자 수산화칼슘이 오랫동안 사용되어 왔으나 수산화칼슘에 의해 생성되는 수복상아질은 많은 경우 뼈모양 상아질(osteodentin)의 구조를 가지고 있어 외부 자극에 대해 치수를 보호하는데 장벽 역할을 하기에 불충분한 것으로 여겨지고 있다(Cox et al., 1996; Higashi and Okamoto, 1996). 이러한 문제점을 극복하기 위해 상아모세포 분화를

\*Corresponding author: Jeong-Hwa Baek, Department of Cell and Developmental Biology, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul 110-749, Korea, Tel.: +82-2-740-8688, Fax.: +82-2-741-3193, E-mail: baekjh@snu.ac.kr

촉진하는 것으로 알려진 bone morphogenetic protein(BMP), transforming growth factor(TGF)- $\beta$ , dentin matrix protein(DMP), bone sialoprotein(BSP), enamel matrix protein(Emdo-gain), ameloblastin fusion protein 등의 다양한 생물학적 제제의 활용가능성에 대해 1990년대 초반 이후 연구가 진행되었으며, 동물실험 결과 많은 경우 재생성 상아질교 생성을 촉진함이 보고되었다(Rutherford et al., 1993; Nakashima, 1994a, 1994b; Jepsen et al., 1997; Tziafas et al., 1995, 1998; Decup et al., 2000; Goldberg et al., 2001; Nakamura et al., 2004, 2006). 그러나 이러한 성장인자 또는 세포외기질 단백질은 생산 비용이 많이 들고 면역반응을 유도할 가능성 등이 있어 실제로 임상에서 쉽게 사용하기에는 어려움이 있다.

치과용 수복제로 널리 사용되는 레진수복제로 치아수복을 하는 경우 polymethyl methacrylate, triethylene glycol dimethacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate 같은 성분이 치수로 확산되어 세포독성을 일으킬 수 있으며, 특히 이들은 활성산소(reactive oxygen species) 생성 및 glutathione 결핍을 유도하여 세포독성을 일으키는 것으로 알려져 있다(Stanislawski et al., 1999, 2000, 2003). N-acetylcysteine(NAC)은 세포막을 통과하여 세포내 glutathione 합성에 사용될 수 있으며 활성산소 제거효과를 보이는 항산화제의 일종이다(Aruoma et al., 1989). 본 연구진은 최근 치은섬유모세포에 lipopolysaccharide를 처리하였을 때 유도되는 염증성 시토카인의 생성 및 matrix metalloproteinase-2 활성화가 NAC에 의해 유의하게 억제되며, NAC가 생쥐 골모세포의 분화를 촉진함을 관찰하였다(Kim et al., 2007; Jun et al., 2008). 이러한 효과를 고려해볼 때 NAC가 치수세포에서 레진수복제에 의한 활성산소의 생성 및 glutathione 결핍을 억제함을 통해 레진수복제에 의한 치수세포 독성 및 염증반응을 억제할 가능성이 있으며, NAC가 치수강에 존재하는 전구 세포로부터 상아모세포로의 분화를 촉진할 수 있다면 수복상아질의 형성도 직접 촉진할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 상아모세포로 분화가 가능한 치유두(dental papilla) 세포를 이용하여 NAC의 항산화 효과를 확인하고 이들 세포의 상아모세포 분화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 세포 배양

생후 2-3일 된 Sprague-Dawley 흰쥐(샘타코, 오산)의 하악골을 분리하고 아직 악골에 매복되어 있는 중상기의 구치를 꺼내 입체현미경 하에서 치유두 부위를 떼어낸 후  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  정도 크기로 잘라 20% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 100 U/ml

penicillin 및 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin을 섞은 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM, Gibco BRL)에서 배양하였다. 자라나온 세포들(rat dental papilla cell; RDPC)을 모두 혼합하여 2차 계대 배양한 후 석회화 결절 형성 실험에 사용하였다. 또한 상아모세포로 분화가 가능한 생쥐 치유두세포주(MDPC-23)를 10% FBS가 함유된 DMEM에 배양하여 사용하였다.

RDPC의 상아모세포 분화를 유도하기 위해 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 20 ng/ml BMP-4 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM, Cambrex, Walkersville, MD, USA)에 2주 또는 4주간 배양한 후 각각 total RNA 추출 및 von Kossa 염색을 시행하였다. MDPC-23은 일반 배양접시 또는 collagen gel이 도포된 배양접시에 세포를 분주하고 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM에서 6~10일 간 배양한 후 total RNA 추출 및 von Kossa 염색 또는 Alizarin red 염색을 시행하였다.

### 세포 증식 측정

NAC가 세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 Cell Counting Kit-8(CCK-8; Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MA, USA)을 이용하여 실험하였다. MDPC-23 세포( $5 \times 10^3/\text{well}$ )를 96 well plate에 분주하고 밤새 배양한 후 1~30 mM NAC(SIGMA, Steinheim, Germany)를 첨가하거나 첨가하지 않고 2, 4, 6일간 배양하였다. 배양이 끝나는 시점에 배양액에 CCK-8 시약을 배양액에 10:1 (v:v) 비율로 섞어 넣고 37°C에서 1시간 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 활성산소 분석

MDPC-23 세포( $5 \times 10^4/\text{well}$ )를 빛이 차단되는 96 well plate에 분주하고 밤새 배양한 후 FBS가 포함되지 않은 배지에서 18시간 동안 배양하였다. 세포에 dichlorofluorescein-diacetate(SIGMA)를 넣고 30분간 전 배양한 후 NAC를 첨가하거나 첨가하지 않고 0, 2, 4, 6 또는 8 시간동안 처리하였다. 그 후 활성산소의 작용에 의해 dichlorofluorescein(DCF)으로 전환된 양을 fluorometer를 이용하여 측정하였다.

### Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 분석

상아모세포 분화 관련 유전자의 발현양상을 확인하기 위해 RT-PCR을 시행하였다. 이를 위해 RDPC와 MDPC-23 세포를 앞에서 기술한 바와 같이 상아모세포로의 분화를 유도하는 배지에서 배양한 후 easy-BLUE<sup>TM</sup> RNA Extraction Reagent(Intron Biotechnology, 서울)를 이용

하여 total RNA를 분리하고, AccuPower RT PreMix-(Bioneer, 대전)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 TaKaRa Taq polymerase를 이용하여 PCR을 시행하였다(TaKaRa, 일본). RT-PCR을 시행한 유전자는 alkaline phosphatase(ALP), type I collagen(Coll( $\alpha$ 1), Runx2, BSP, osteopontin(OPN), osteocalcin(OC), osteonectin, dentin sialophosphoprotein(DSPP), DMP-1, matrix extracellular phosphoglycoprotein(MEPE), BMP-2, BMP-4, BMP-7, fibroblast growth factor(FGF)-2, TGF- $\beta$ 1, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH),  $\beta$ -actin이며, 이들 유전자의 PCR에 사용한 primer 서열은 Table 1과 같다.

**Table 1.** Sequences of PCR primers.

Genes	Primer Sequences
<i>m</i> ALP	F: 5'-AGGCAGGATTGACCACGG-3' R: 5'-TGTAGTTCTGCTCATGGA-3'
<i>m</i> Coll( $\alpha$ 1)	F: 5'-GAAGTCAGCTGCATACAC-3' R: 5'-AGGAAGTCCAGGCTGTCC-3'
<i>m</i> OPN	F: 5'-CGATGATGATGACGATGGA-3' R: 5'-GGCTTTGGAAGTTGCTTGA-3'
<i>m</i> Runx2	F: 5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3' R: 5'-CGCTCCGGCCACAAATCTC-3'
<i>m</i> OC	F: 5'-CCTGAAGTCTCACAATCTGC-3' R: 5'-CACAAGCAGGTTAAGCTCAC-3'
<i>m</i> BSP	F: 5'-GTCAACGGCACCAGCACCAA-3' R: 5'-GTAGCTGTATTCTGCTCAT-3'
<i>m</i> DSPP	F: 5'-CCAAAGAATCTGGGAAACTC-3' R: 5'-AAGAAGCATCTCACGC-3'
<i>m</i> DMP-1	F: 5'-AACTGGACAGTGATGAGGAC-3' R: 5'-TTTAGATTCTTCCGACCTGA-3'
<i>m</i> MEPE	F: 5'-TGCCCTCTCACAGTCTTAGT-3' R: 5'-ATTTAATGTGTCGCCTGTC-3'
<i>m</i> BMP-2	F: 5'-CGGGAACAGATACAGGAA-3' R: 5'-GCTGTTTGTGTTGGCTTGA-3'
<i>m</i> BMP-4	F: 5'-CGTTACCTCAAGGGAGTGA-3' R: 5'-CACACCCCTCTACCACCATC-3'
<i>m</i> BMP-7	F: 5'-TACGTACAGTTCAGAGACCT-3' R: 5'-GCTCAGGAGGTTGGTCTG-3'
<i>m</i> FGF-2	F: 5'-AGCGGCTCTACTGCAAGAAC-3' R: 5'-TATGGCCTTCTGTCCAGGTC-3'
<i>m</i> TGF- $\beta$ 1	F: 5'-ATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3' R: 5'-TGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'
<i>m</i> GAPDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
<i>r</i> ALP	F: 5'-GAAAGAGAAAGACCCCAG-3' R: 5'-ACCACCCATGATCACATC-3'
<i>r</i> Coll( $\alpha$ 1)	F: 5'-AAGAAGGCGCAAAGGTC-3' R: 5'-GGACCTTGTGGCCAGGT-3'
<i>r</i> DSPP	F: 5'-CGAGTCGATAGCCGTAGGAG-3' R: 5'-AACTCCACTCCCGTGTGTTTC-3'
<i>r</i> Osteonectin	F: 5'-CTGCGTGTGAAGAAGATCCA-3' R: 5'-GGTCTCAAAGAAGCGAGTGG-3'
<i>r</i> $\beta$ -actin	F: 5'-ATGGGTCAGAAGGACTCCTAC-3' R: 5'-ATGGGTCAGAAGGACTCCTAC-3'

*m*; mouse, *r*; rat

PCR 산물을 1.2 % agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

### 석회화 결절 형성 관찰

석회화 결절 형성 정도를 확인하기 위해 von Kossa 또는 Alizarin red 염색을 시행하였다. RDPC 세포의 배양이 끝난 뒤 von Kossa 염색을 시행하였으며, 그 과정을 간단히 살펴보면 세포를 PBS로 세척하고 10 % neutral buffered formalin에서 30분간 고정하고, 5 % silver nitrate(SIGMA) 용액에서 15분간 염색을 시행한 후 증류수로 세척하고 관찰하였다.

MDPC-23세포의 경우 일반 배양접시에서 배양한 경우 상아모세포 분화배지로 배양하면 일주일 이내에 세포가 바닥에서 통째로 떨어져 일주일 이상 배양을 지속할 수 없었으므로 배양 6일째 세포를 수집하여 PBS로 세척하고 파라인 포매한 후 조직 박편을 제작하고 이를 이용하여 H&E 염색과 von Kossa 염색을 시행하였다. MDPC-23 세포를 collagen gel에서 배양한 경우 10일 이상 배양이 가능하였으므로 현미경으로 관찰하면서 석회화결절 형성이 충분히 관찰되는 시점까지(10~18일) 배양하였다. collagen gel에서 배양한 세포를 von Kossa 염색하는 경우 collagen gel 자체가 염색이 진하게 되어 석회화결절의 구별이 어려워 대신 Alizarin red 염색을 시행하였다. Alizarin red 염색을 위해 배양된 세포를 PBS로 세척하고 70 % ethanol에서 1시간 고정한 후 40 mM Alizarin red S(pH 4.2, SIGMA) 용액에서 10분간 염색하고 증류수로 세척한 뒤 관찰하였다.

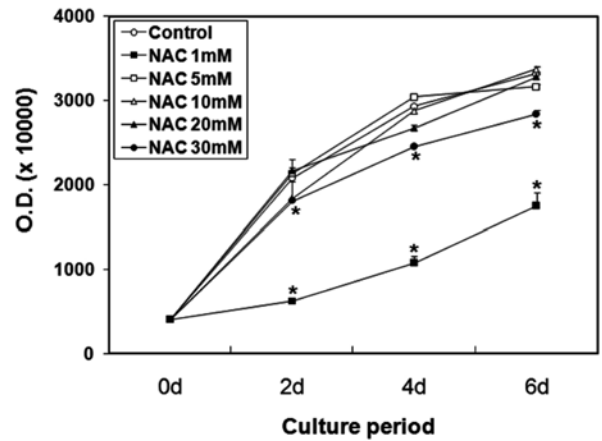
### 실험결과

본 연구에서는 NAC의 상아모세포 분화 조절 효능을 관찰하기 위해 MDPC-23 세포주 및 흰쥐 치유두 일차 배양세포인 RDPC를 사용하였다. 먼저 NAC가 치유두 세포에서도 항산화효과를 보이는지 확인하기 위해 MDPC-23세포에 1~30 mM NAC를 처리하여 활성산소 생성이 억제되는지 관찰한 결과, 기존에 잘 알려진 바와 같이 MDPC-23 세포에서도 NAC 농도의존적으로 활성산소 생성이 감소됨이 확인되었다(Fig. 1). 1 mM NAC의 경우 초반에는 활성산소 억제 효과가 뚜렷하였지만 시간이 지날수록 이러한 억제효과가 감소하였고 24시간이 지난 후에는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(결과제시하지 않음). 이러한 활성산소 생성 억제효과가 세포 증식 억제와 관련된 것인지 확인하고자 세포 증식에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 2). 5~20 mM NAC는 MDPC-23 세포의 증식에 별다른 영향을 미치지 않았지만 30 mM 농도에서는 유의하게 세포 증식을 억제하였다. 특히 하계도 항산화효과가 가장 작았던 1 mM NAC는 30 mM

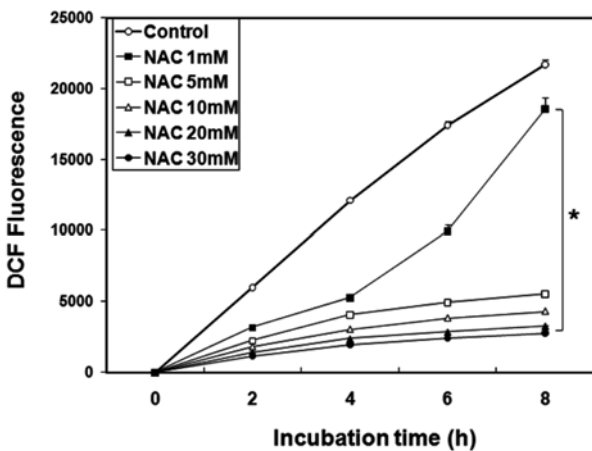
에서보다 세포증식을 더 강력하게 억제하였다.

NAC가 치유두 세포의 상아모세포 분화에 영향을 미치는지 확인하기 위해 먼저 흰쥐 치유두의 일차배양세포를 이용하여 석회화결절 형성에 미치는 영향을 관찰하였다. 기존의 보고에 따르면 BMP-4는 중배엽세포를 상아모세포로 유도하는데 관여하는 것으로 알려져 있으므로(Thesleff, 2003), RDPC에 BMP-4를 첨가하여 상아모세포 분화를 유도하였다. 기존의 보고에서 생쥐 골모세포에 대한 분화 효과가 20 mM NAC에서 가장 뚜렷이 나타났고(Jun et al., 2008), 이 농도의 NAC는 MDPC-23세포에서 세포 증식을 억제하지 않으면서 항산화효과가 크게 나타났으므로 20 mM NAC를 4주간 RDPC에 처리한 결과 대조군에 비해 von Kossa 염색이 좀 더 강하게 됨이 확인되었다(Fig. 3A). 이러한 석회화결절 형성 양상이 상아모세포 분화와 관련된 유전자의 발현과 연관이 있는지 확인하고자, 상아모세포 분화유도 조건에서 NAC를 2주간 처리하고 ALP, Col1( $\alpha$ )1, DSPP, osteonectin의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 이들 유전자는 골모세포에서도 발현되므로 상아모세포 특이 유전자는 아니지만 생체 내 또는 시험관 내 실험을 통해 상아모세포에서 발현됨이 확인되어 상아모세포 분화여부를 관찰할 때 사용되는 상아모세포 분화표지 유전자들에 속한다(Goldberg et al., 2006). RT-PCR로 이들 유전자 발현정도를 관찰한 결과, von Kossa 염색결과와 유사하게 ALP, Col1( $\alpha$ )1, osteonectin의 mRNA 발현은 NAC 처리에 의해 증가되는 양상을 보였으나 DSPP의 경우 별다른 차이를 보이지 않았다. 이러한 효과가 상아모세포-유사 세포에서도 유사하게 나타나는지 보기 위해 MDPC-23 세포에서 NAC의 효과를 관찰하였다. MDPC-23 세포를 배양조건에서 배양하는 경우 ascorbic acid와  $\beta$ -glycerophosphate가 함유된

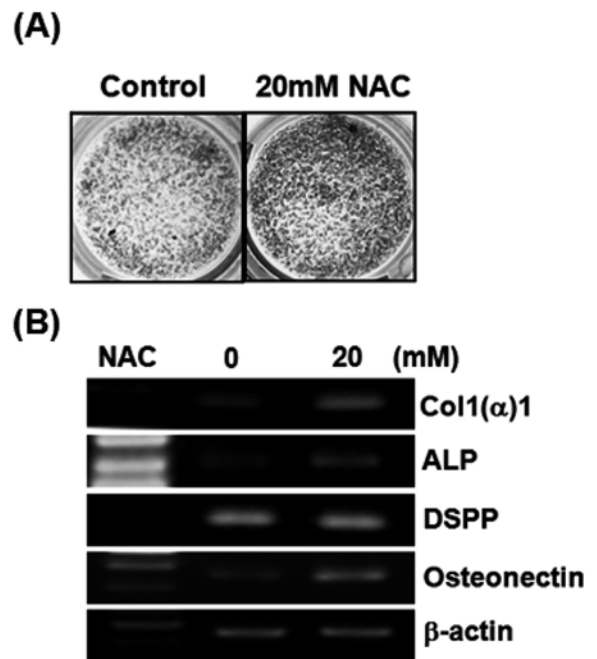
분화배지에서 배양하면 1주일 이상 장기 배양이 어려웠기 때문에 배양 6일째 세포를 수집하여 파라핀 포매 후 조직절편을 제작하고 이를 이용하여 von Kossa 염색을 시행하였다. 대조군 세포에서는 von Kossa 염색상이 뚜



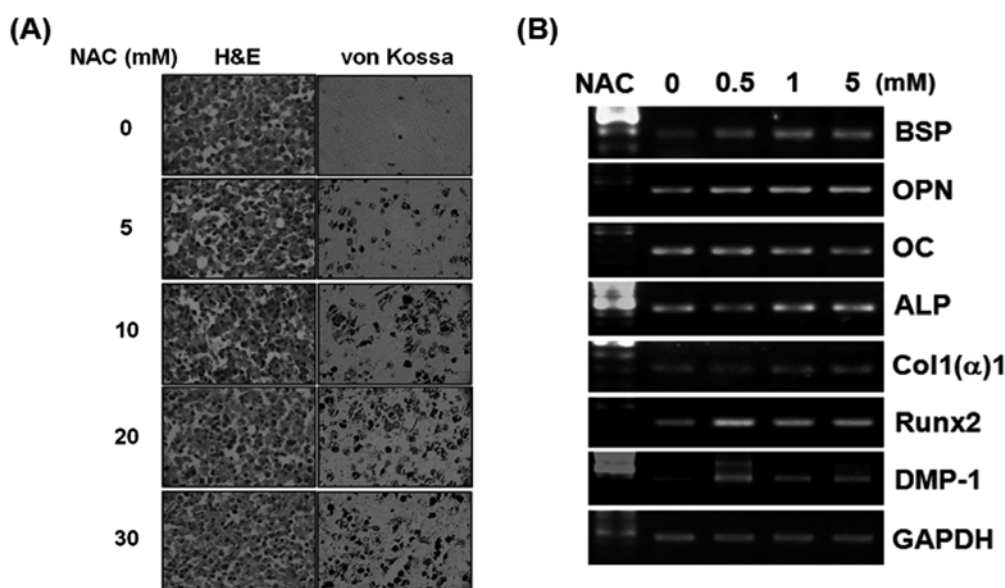
**Fig. 2.** NAC inhibited proliferation of MDPC-23 cells at high (30 mM) and low (1 mM) concentration. Cells were cultured in the presence or absence of NAC for 2, 4, 6 days and CCK-8 reagents were used for measuring the proliferation activity. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (N=4). \*  $p < 0.01$ , significantly different from the control.



**Fig. 1.** NAC suppressed reactive oxygen species (ROS) production in MDPC-23 cells. Intracellular ROS level was measured by detecting ROS-mediated conversion of DCFH-DA to DCF. Data represent mean  $\pm$  S.E. (N=4) and statistical differences were analyzed using the Student's *t*-test. (\*  $p < 0.01$ ).



**Fig. 3.** NAC enhanced odontogenic differentiation of RDPCs. (A) RDPCs were cultured for 4 weeks in differentiation medium consisting of  $\alpha$ -MEM supplemented with 10 % FBS, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate and 20 ng/ml BMP-4. Then, von Kossa's staining was performed. (B) RDPCs were cultured for 2 weeks in differentiation medium and then, total RNAs were isolated and gene expression level was examined by semiquantitative RT-PCR.



**Fig. 4.** NAC enhanced odontogenic differentiation of MDPC-23 cells cultured in plain tissue culture dish. Cells were seeded on plain culture dish and cultured in odontoblast differentiation medium consisting of  $\alpha$ -MEM supplemented with 10 % FBS, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate for 6 days. NAC was added to the culture medium for the whole culture period. (A) Then, cells were pelleted, fixed and paraffin-embedded. H&E staining or von Kossa staining was performed using paraffin-sectioned cell pellet. (B) Total RNAs were isolated and gene expression level was examined by semiquantitative RT-PCR. At the end of culture, von Kossa's staining was performed.

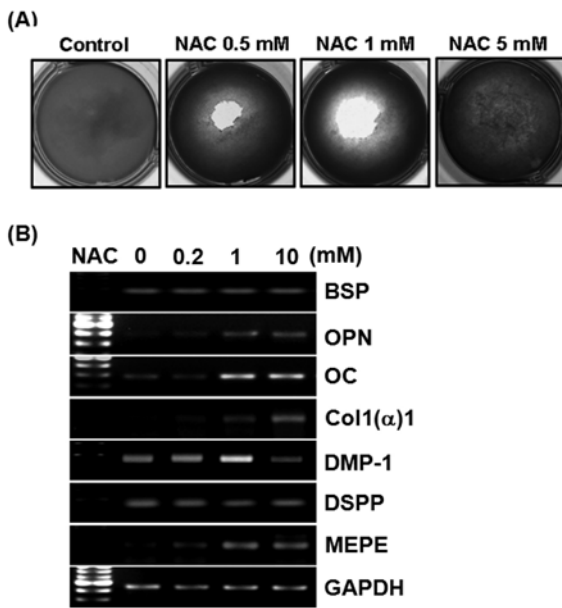
렸하지 않았지만 5~30 mM NAC를 첨가해준 경우 20 mM 정도까지는 농도의존적으로 염색정도가 증가하는 양상을 보였다(Fig. 4A). 이런 염색상이 상아모세포 분화 관련 유전자 발현과 연관성이 있는지 확인하고자 RT-PCR로 유전자 발현을 조사한 결과 전사인자인 Runx2의 발현이 대조군에 비해 약간 증가되었고, BSP, OPN, ALP 및 DMP-1의 발현이 대조군에 비해 약간 증가됨이 관찰되었으나 DSPP 전사체의 발현은 잘 관찰되지 않았다(Fig. 4B). 세포분화를 더 진행시키면서 배양접시 바닥에서 떨어지지 않도록 여러 가지 방법을 시도한 가운데 collagen gel 상에서 배양한 경우 더 오랫동안 배양이 가능함을 확인하고 그 상태에서 다시 상아모세포 분화를 유도한 결과 10일을 전후하여 현미경하에서 충분한 석회화결절 형성이 관찰되었으므로 10일째 Alizarin red로 염색하였다. Collagen gel에서 염료가 잘 씻겨나가지 않아 대조군에서도 전반적으로 Alizarin red 염색상을 보였지만 NAC를 처리한 세포들에서 석회화결절의 염색을 통해 대조군에 비해 좀 더 붉게 염색되는 양상을 보였다(Fig. 5A). 일반 배양접시에서 배양한 것과 비교하여 collagen gel에서 배양한 세포에서는 MDPC-23 세포 자체의 유전자 발현에 변화가 있었으며, 특히 BSP와 DSPP의 발현이 증가하였고 대신 ALP, Col1( $\alpha$ )1의 발현은 오히려 감소하였다(결과보이지 않음). Collagen gel에서 배양한 세포에 NAC를 처리한 경우 이미 발현이 많이 증가되어 있던 BSP와 DSPP에는 아무런 영향을 미치지 못하였지만, OPN, OC, Col1( $\alpha$ )1, MEPE의 발현은 증가하

였다(Fig. 5B). DMP-1의 경우에는 1 mM NAC에서 뚜렷한 발현증가가 관찰되었다.

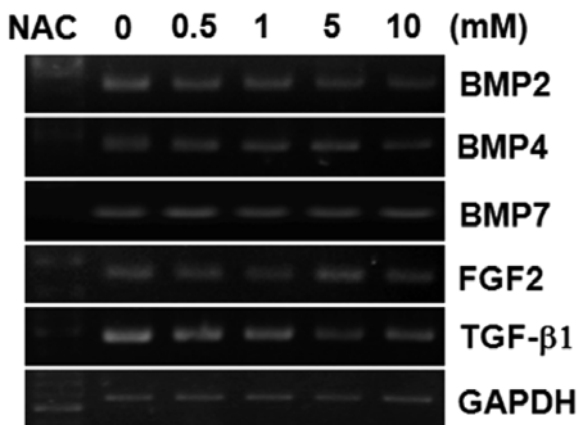
NAC에 의한 상아모세포 분화 촉진효과가 BMP, TGF- $\beta$ 1, FGF2 등의 성장인자 발현 촉진과 관련이 있는지 확인하고자 MDPC-23 세포에서 이들의 발현을 관찰하였다. 상아모세포 분화를 촉진하는 농도에서 NAC는 BMP-2, -4, -7 및 FGF2의 발현에 뚜렷한 조절효과를 보이지 않았고 오히려 TGF- $\beta$ 1의 발현을 농도의존적으로 감소시키는 양상을 나타내었다(Fig. 6).

## 고 찰

상아모세포는 치아 발생과정 중에 치유두에 존재하는 신경능선 유래 세포에서 분화되므로, 상아모세포로 분화 가능한 세포주를 확립하는데 치유두가 사용되기도 한다. MDPC-23 세포는 CD-1 생쥐의 치유두에서 분리된 세포 중 자연스럽게 불멸화되어 확립된 세포주로 DSPP 같은 상아모세포 분화표지인자를 발현하므로 상아모세포 유사 세포로 알려져 있다(Sun et al., 1998). 이러한 특성 때문에 시험관내 상아모세포의 기능 연구 등에 많이 이용되고 있다(Shin et al., 2006). 본 연구에서는 NAC의 상아모세포 분화 조절 효능을 관찰하기 위해 MDPC-23 세포주 및 흰쥐 일차배양세포를 사용하였다. 기존에 잘 알려진 바와 같이 NAC는 이들 세포에서 농도의존적으로 강력한 항산화효과를 나타내었다. 또한 고농도(30 mM)의



**Fig. 5.** NAC enhanced odontogenic differentiation of MDPC-23 cells cultured on collagen gel. Cells were seeded on collagen gel-coated culture dish and cultured in odontoblast differentiation medium consisting of  $\alpha$ -MEM supplemented with 10 % FBS, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate for 10 days (A) or 6 days (B). NAC was added to the culture medium for the whole culture period. At the end of culture period, Alizarin red staining (A) or total RNA preparation and RT-PCR (B) was performed.



**Fig. 6.** NAC did not induce the mRNA expression of BMPs and FGF2. MDPC-23 cells were seeded on plain tissue culture dish and cultured in differentiation medium for 3 days. Then, total RNA preparation and RT-PCR was performed.

NAC는 세포 증식 억제 효과도 나타내었다. 그러나 특히 하계도 항산화효과가 가장 작았던 1 mM NAC는 30 mM 에서보다 세포증식을 더 강력하게 억제하였다. 이러한 결과로 보아 MDPC-23 세포에서 NAC에 의한 활성산소 감소효과는 세포수 감소에 따라 이차적으로 나타난 현상 이라기보다 직접 활성산소를 제거함에 의한 것으로 생각

된다. 상아모세포와 유사하게 석회화결절을 형성할 수 있는 생쥐 골모세포의 경우 NAC는 20 mM 이상의 농도에서 세포증식을 유의하게 억제하였으나 그 이하의 농도에서는 별다른 억제효과를 보이지 않았다(결과보이지 않음). 또한 세포증식과 관련하여 NAC의 효능을 보고한 기존의 논문을 살펴보면, 암종에서 유래한 세포주에 10~80 mM NAC를 처리한 경우 세포내 p21<sup>Waf1/Cip1</sup>의 존재여부에 따라 세포독성 없이 세포증식만 억제되거나 또는 세포고사가 유발된다는 보고가 있었으며(Nargi et al., 1999), L6 근육모세포에 5~20 mM NAC를 처리하는 경우 농도 의존적으로 세포 증식이 촉진됨이 보고된 바 있다(Kim et al., 2006). 한편 암종 세포주나 정상 상피각화세포에 NAC를 처리한 경우 0.5 mM 이하 농도에서는 세포증식이 촉진되지만 그 이상의 농도에서는 세포독성 없이 세포증식이 억제된다는 보고(Parasassi et al., 2005)도 있어 NAC가 세포 증식에 미치는 영향은 세포의 종류에 따라, 사용된 농도에 따라 다르게 나타날 수 있음을 시사하였다. NAC에 의해 세포증식이 억제된다고 보고된 세포 시스템에서 세포증식 억제 효과가 활성산소 감소와 관련이 있다는 보고도 있지만(Nargi et al., 1999), NAC가 세포 내 thiol의 산화환원 상태 변화를 통해 세포 분화를 촉진하는 효과와 연계되어 세포증식을 억제한다는 보고도 있다(Parasassi et al., 2005). 생쥐 골모세포에서는 활성산소 억제와 무관하게 NAC가 RhoA 활성화 억제를 통해 골모세포 분화를 촉진하는 것으로 보고된 바 있고(Jun et al., 2008), 본 연구에서 NAC에 의한 상아모세포 분화 촉진 효과가 1 mM 농도에서도 잘 나타나고 있으며 MDPC-23 세포에서 세포증식에 대한 NAC의 효과가 NAC의 항산화효과와 정비례하지는 않았으므로 활성산소 형성 억제효능 외에 다른 기전을 통해서 NAC가 MDPC-23 세포의 증식을 조절할 가능성이 있는 것으로 생각되었다.

NAC가 상피세포에서 세포분화를 촉진하며 생쥐 골모세포의 분화 및 석회화결절 형성도 강력하게 촉진한다는 보고들(Parasassi et al., 2005; Jun et al., 2008)과 유사하게 NAC는 RDPC 및 MDPC-23 세포에 의한 석회화결절형성 및 상아모세포 분화 관련 유전자의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 비록 관찰한 모든 유전자에서 동일한 반응이 보인 것은 아니지만 전반적으로 NAC에 의해 이들 유전자의 발현이 증가되는 성향을 보였으나 DSPP의 경우 두 세포 모두에서 NAC에 의한 발현 촉진 효과는 관찰되지 않았다. DSPP는 상아모세포 분화를 확인하는데 흔히 사용되는 분화표지 유전자이고, DMP-1는 유전자 발현이 결핍된 생쥐에서 상아질형성부전증의 표현형을 나타내는 것으로 알려져 있어 DSPP와 더불어 상아모세포의 또 다른 대표 분화표지로 여겨지고 있다(Ye et al., 2004; Aikawa et al., 2006). 비록 NAC가 DSPP의 발현을 증가시키지는 않았지만 DMP-1의 발현은 뚜

렸이 증가시켰으므로 NAC가 MDPC-23 세포의 상아모세포로의 분화를 촉진하는 효과가 있는 것으로 생각된다. 상아모세포 분화초기에 DMP-1은 핵내에서 전사인자로 작용하여 DSPP 발현을 촉진하는 것으로 보고된 바 있으나(Narayanan et al., 2006), MDPC-23 세포를 분화배지에서 3일 배양한 경우 DMP-1 및 DSPP의 발현은 모두 관찰되지 않았다(결과보이지 않음). 또한 지방유래 줄기세포에 DSPP를 과발현하면 DMP-1을 포함한 상아모세포 분화표지 유전자의 발현이 모두 증가되고 석회화결절 형성을 촉진된다고 보고된 바 있으나(Wu et al., 2008) 본 연구 결과에 의하면 DSPP의 발현정도와 다른 상아모세포 분화 관련 유전자의 발현에는 아무런 상관관계를 찾을 수 없었다. 이러한 결과로 보아 사용한 세포 및 배양 조건의 종류에 따라 유전자 발현이 서로 다르게 조절되는 것으로 생각되었다.

상아모세포와 골모세포는 생체 내에서 세포의 구조 및 이들에 의해 만들어지는 상아질과 뼈의 조직학적 특성이 뚜렷이 구분되지만, 두 세포 모두 세포외기질을 분비하고 석회화를 조절할 수 있으며 분화된 세포에서 발현되는 유전자의 종류가 상당히 유사하므로 시험관 내에서 분화된 세포가 두 세포 중 어느 세포인지 뚜렷이 구별하기는 어렵다(Goldberg et al., 2006). 그러나 생쥐 골모세포에 대한 NAC의 효과와 비교해 볼 때, 골모세포에서는 10 mM 이하 농도의 NAC는 골모세포 분화 및 증식에 유의한 효과를 나타내지 않은 반면(Jun et al., 2008), MDPC-23 세포에서는 1 mM 정도의 농도에서도 세포증식 및 분화표지 유전자의 발현에 유의한 효과를 나타내는 차이가 있었다. 또한 골모세포에서는 NAC 처리에 의해 석회화결절 형성이 증가함에 따라 골모세포 분화표지 유전자 발현정도가 비례적으로 증가하는 양상을 나타낸 반면 MDPC-23 세포에서는 석회화결절 형성 정도와 분화표지 유전자의 발현 간에 꼭 비례관계를 보이지는 않았다. 이러한 차이가 일차배양 세포와 불멸화된 세포간의 반응의 차이에 의한 것인지 아니면 세포 유래가 뼈와 치유두로 서로 달라서 생긴 것인지 명확하지는 않다. 비록 세포의 종류에 따라 NAC에 대한 민감성이 다르게 나타나기는 했지만 세포분화를 촉진하는 현상은 공통적으로 나타나므로 생체 내에서 NAC의 수복상아질 생성능 여부에 대한 추가적 연구가 필요하다 하겠다.

골모세포에서 석회화결절 형성 및 분화표지 유전자 발현을 촉진시키는 농도의 NAC(10~30 mM)는 BMP의 발현을 증가시키는 효과를 나타내며(Jun et al., 2008), BMP, TGF- $\beta$ 1, FGF2 등의 성장인자가 생체 내에서 수복상아질의 형성 촉진 및 줄기세포의 상아모세포 분화를 촉진한다는 보고가 있으므로(Nakashima, 1994; Tziafas et al., 1998; Chen et al., 2008; He et al., 2008), NAC가 MDPC-23 세포에서 이들의 발현을 조절하는지 관찰하였다. 골모세포에서의 반응과 달리 상아모세포 분화를 촉진

하는 농도에서 NAC는 이들 성장인자의 발현을 증가시키지 않았으므로, NAC에 의한 상아모세포 분화 촉진과정에서는 이들 성장인자가 관여하지는 않는 것으로 생각되었다.

기존에 보고된 논문에서 Goldberg et al.(2001)은 비록 실험결과를 직접 제시하지는 않았지만 NAC를 치수복조제(pulp capping agent)로 사용하였을 때 수복상아질 생성이 유도되었다고 기술한 바 있어 생체 내에서도 상아모세포 분화효과를 나타낼 가능성이 있을 것으로 생각된다. 본 연구를 수행하는 동안 NAC를 레진수복제에 포함시키면 치수세포에 대한 레진수복제의 세포독성이 감소된다는 연구결과들이 보고되었다(Kojima et al., 2008; Paranjpe et al., 2008). 또한 Paranjpe et al.(2007)은 흰쥐 치수줄기세포를 이용하여 20 mM NAC가 2-hydroxyethyl methacrylate에 의한 세포사를 억제하고 또 OPN, OC, DSP의 발현을 증가시키며, 이러한 NAC의 효능은 vitamin C나 vitamin E 같은 항산화제에 의해서는 나타나지 않으므로 이러한 효능이 활성산소 제거와 관련이 없다고 보고하였다. 세포내 thiol기의 산화환원 상태가 여러 세포내 신호전달경로에 영향을 미치며 전사인자의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있으므로 NAC의 분화촉진 효과에 세포내 thiol 기의 산화환원 상태 조절이 중요한 표적으로 작용할 것으로 생각되며 이에 대한 추가적 연구가 필요한 것으로 생각된다. 이상에 기술된 선행 연구 결과와 본 연구 결과를 종합해볼 때 레진수복제를 이용한 치수수복과정에서 NAC를 이용하면 치수손상을 최소화하고, 기계적으로 손상된 치수에서 수복상아질 생성을 촉진할 가능성이 높으며, 기존의 논문들에서 사용된 성장인자나 세포외기질 단백질과 달리 NAC는 작은 분자로 현재 여러 전신질환의 치료에도 사용되어 이미 안전성이 확인되어 있으며 경제적으로 효율적이므로 치과 임상에서의 이용가능성을 시험해볼 적절한 약물이라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A050189).

## 참고 문헌

- Aikawa F, Nakatsuka M, Kumabe S, Jue SS, Hayashi H, Shin JW, Iwai Y. Expression of DSPP mRNA during differentiation of human dental pulp-derived cells (HDPC) and transplantation of HDPC using alginate scaffold. *Int J Oral Biol.* 2006;31:73-9.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant

- action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989;6:593-7.
- Chen S, Gluhak-Heinrich J, Martinez M, Li T, Wu Y, Chuang HH, Chen L, Dong J, Gay I, MacDougall M. Bone morphogenetic protein 2 mediates dentin sialophosphoprotein expression and odontoblast differentiation via NF- $\kappa$ B signaling. *J Biol Chem.* 2008;283:19359-70.
- Cox CF, Subay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent.* 1996;21:4-11.
- Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig.* 2000;4:110-9.
- Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili Majd E, Lasfargues JJ, Salih E, Stanislawski L. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res.* 2001;15:91-5.
- Goldberg M, Lacerda-Pinheiro S, Jegat N, Six N, Septier D, Priam F, Bonnefoix M, Tompkins K, Chardin H, Denbesten P, Veis A, Poliard A. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry. *Dent Clin North Am.* 2006;50:277-98.
- He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 and TGF $\beta$ 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int.* 2008;32:827-34.
- Higashi T, Okamoto H. Characteristics and effects of calcified degenerative zones on the formation of hard tissue barriers in amputated canine dental pulp. *J Endod.* 1996;22:168-72.
- Jepsen S, Albers HK, Fleiner B, Tucker M, Rueger D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J Endod.* 1997;23:378-82.
- Jun JH, Lee SH, Kwak HB, Lee ZH, Seo SB, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH. N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. *J Cell Biochem.* 2008;103:1246-55.
- Kim do Y, Jun JH, Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH, Han SB. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res.* 2007;30:1283-92.
- Kim GH, Song DK, Cho CH, Yoo SK, Kim DK, Park GY, Suh SI, Jang BC, Lim JG. Muscular cell proliferative and protective effects of N-acetylcysteine by modulating activity of extracellular signal-regulated protein kinase. *Life Sci.* 2006;79:622-8.
- Kojima N, Yamada M, Paranjpe A, Tsukimura N, Kubo K, Jewett A, Ogawa T. Restored viability and function of dental pulp cells on poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin supplemented with N-acetyl cysteine (NAC). *Dent Mater.* 2008;24:1686-93.
- Nakamura Y, Slaby I, Matsumoto K, Ritchie HH, Lyngstadaas SP. Immunohistochemical characterization of rapid dentin formation induced by enamel matrix derivative. *Calcif Tissue Int.* 2004;75:243-52.
- Nakamura Y, Slaby I, Spahr A, Pezeshki G, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. Ameloblastin fusion protein enhances pulpal healing and dentin formation in porcine teeth. *Calcif Tissue Int.* 2006;78:278-84.
- Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res.* 1994a;73:1515-22.
- Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol.* 1994b;39:1085-9.
- Narayanan K, Gajjeraman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2006;281:19064-71.
- Nargi JL, Ratan RR, Griffin DE. p53-independent inhibition of proliferation and p21(WAF1/Cip1)-modulated induction of cell death by the antioxidants N-acetylcysteine and vitamin E. *Neoplasia.* 1999;1:544-56.
- Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:1394-408.
- Paranjpe A, Sung EC, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-acetyl cysteine protects pulp cells from resin toxins in vivo. *J Dent Res.* 2008;87:537-41.
- Parasassi T, Brunelli R, Bracci-Laudiero L, Greco G, Gustafsson AC, Krasnowska EK, Lundeberg J, Lundeberg T, Pittaluga E, Romano MC, Serafino A. Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms. *Cell Death Differ.* 2005;12:1285-96.
- Ruch JV, Lesot H, Bégue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995;39:51-68.
- Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol.* 1993;38:571-6.
- Shin MS, Yeon KY, Oh SB, Kim JS. Expression of TRP channels in mouse dental papilla cell-23 (MDPC-23) cell line. *Int J Oral Biol.* 2006;31:135-40.
- Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bégue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995;39:273-80.
- Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999;48:277-88.
- Stanislawski L, Soheili-Majd E, Perianin A, Goldberg M. Dental restorative biomaterials induce glutathione depletion in cultured human gingival fibroblast: protective effect of N-acetyl cysteine. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:469-74.
- Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66:476-82.
- Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Bégue-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;37:251-61.
- Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003;116:1647-8.
- Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol.* 1995;39:281-90.
- Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res.* 2004;38:314-20.
- Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, Ruch JV. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol.* 1995;40:883-93.
- Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral Biol.* 1998;43:431-44.
- Wu L, Zhu F, Wu Y, Lin Y, Nie X, Jing W, Qiao J, Liu L, Tang W, Zheng X, Tian W. Dentin sialophosphoprotein-promoted mineralization and expression of odontogenic genes in adipose-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs.* 2008;187:103-12.
- Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z, Lu Y, Mishina Y, Feng JQ. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *J Biol Chem.* 2004;279:19141-8.