대한구강해부학회지 2006년
30(1) : 19~26

노출된 흰쥐 치수 치유과정중 BMP와 BMP 수용체 분포에 관한 연구

경희대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실

박선영 · 신제원 · 주성숙*

I. 서 론

치수조직은 상아질에 둘러싸여 있는 연결합조직으로, 상아질을 형성하는 상아모세포를 포함하고 있다. 치수조직과 상아질은 하나의 복합체로서, 지속적인 상아질의 형성, 영양공급, 신경지배 및 면역반응을 통한 방어의 역할을 한다[1].

치아우식과 같은 치아 손상이 깊어 치아수복시술중 치수가 노출되는 경우, 치수복조술을 시행하게 되면 손상된 치수조직이 재생되고 상아모세포와 유사한 세포가 분화되어 수복상아질이 형성되어 남아있는 치수조직을 보호하게 된다[2]. 치수-상아질 복합체의 치유과정은 복잡한 과정이며, transforming growth factor-betas (TGF-βs), bone morphogenetic proteins (BMPs), insulin-like growth factors (IGFs), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF)와 같은 많은 성장인자들이 관여한다. 이러한 성장인자들이 배양된 치수세포가 상아모세포로 분화하여 상아질을 형성하는 과정에 관여한다는 보고가 있어왔지만, 치수의 치유과정중 세포수준에서의 기전은 아직 충분히 파악되지 못하고 있다.

BMP는 1965년 Urist[3]가 수 종의 산으로 탈회한 뼈바탕질을 근육 또는 피하에 이식하여 뼈가 유도됨을 확인함으로써 그 존재가 알려진 이래 뼈의 치유과정을 돕기 위한 인자로 사용하기 위한 여러 연구가 시행되어 왔으며, 근래에는 치아조직의 발생 및 치유과정에서의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[4-8].

합성된 사람 BMP-2를 이용한 실험에서, BMP-2가 사람 성인의 치수세포가 상아모세포로 분화하는 것을 촉진한다는 보고가 있었으며[9,10], 삼차원 조직배양을 통해서도 같은 결과가 보고되었다[11].

이와 같이 BMP가 치수조직의 재생과정을 촉진할 뿐 아니라 치수세포가 상아모세포 유사세포로 분화하여 상아질과 유사한 바탕질을 합성하는 것을 촉진한다는 사실이 많은 배양실험을 통해 이루어져 왔으나, 생체에서 치수 재생과정을 통해 발현 강도와 위치가 어떻게 변화하는지를 관찰한 실험은 부족한 것으로 보인다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐 치수를 노출시키고, 치수조직의 치유과정중에 BMP-2 및 BMP-2 수용체의 위치의 변화를 면역조직화학적 방법을 통해 밝힘으로써, 손상된 치수조직의 재생 과정에서 BMP-2의 역할에 대해 알아보고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

실험재료로는 체중 250 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐 30마리를 사용하였다.

* 교신저자.

2. 실험방법

1) 치수노출

흰쥐에게 케타민 (유한양행) 0.5 mg/kg을 복강내 주사하여 마취시킨 후, #1/2 round bur로 상악 제1구치 교합면을 삭제하여 직경 약 1 mm로 치수를 노출시켰다. 치수를 노출시키고 1일, 3일, 7일, 14일에 4% paraformaldehyde로 심장을 통한 관류고정으로 희생하였다.

2) 면역염색

희생된 흰쥐의 상악 1구치를 포함하는 상악골을 취하여, 불필요한 조직을 정리한 후 10% EDTA 용액으로 3주간 탈회하였다. 그 후 OCT compound로 포매하여 냉동절편기로 30 ㎛ 두께의 연속절편을 얻었다.

이렇게 얻은 조직절편은 0.01M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2)로 수세한 후 내재성 과산화효소에 의한 가양성반응을 없애기 위해 methanol에 희석한 0.3% 과산화수소수로 실온에서 30분간 처리하였다. 다시 0.01M PBS로 수세하고 정상혈청으로 20분간 반응시킨 후 여분의 혈청을 제거하고 anti-BMP-2 항체 (Sigma, USA) 혹은 anti-BMP-2 수용체 (Santa Cruz) 항체를 적용하여 2시간 반응시켰다.

조직절편을 0.01M PBS로 2회 수세하고 Vectastain Elite Kit (Vectastain)의 이차항체로 30분간 반응시킨 후 다시 0.01M PBS로 2회 수세하고 avidin-biotin conjugate reagent로 실온에서 30분간 반응시켰다. 절편을 다시 0.01M PBS로 수세한 후 암조건에서 DAB-Ni로 발색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 실험결과

치수 노출 1일째 치관부 치수의 손상부위는 혈병으로 가득 차있었으며, 치수 노출부위에 인접한 건강한 조직의 세포들에서 강한 BMP-2 면역반응을 보였다 (Fig. 1). BMP-2 면역양성반응은 치관부 치수에서도 치수 노출부위에서 멀어질수록 점점 약해졌으며, 치근부 치수에 이르러서는 면역반응은 거의 사라지는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2).

치수 노출 3일째 치관부 치수강에는 혈병과 염증세포는 1일군에 비해 현저하게 사라졌으며, 1일째 치수 노출부위 바로 인접한 부분에 한정되어 나타나던 BMP-2 면역반응이 좀 더 넓은 부위에서 나타나는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3). 노출 1일째까지 BMP-2 면역반응을 보이지 않던 치근부 치수에서는 혈관 주변에 국한되어 강한 BMP-2 면역양성반응을 보였다 (Fig. 4).

치수 노출 7일째에는 BMP-2 면역양성반응을 보이는 부위가 넓어져서, 치관측 치수 전반에서 균일한 정도의 BMP-2 면역양성반응을 보였다 (Fig. 5). 이 시기의 치근부 치수에서는 3일째와 마찬가지로 혈관주변에 국한되어 BMP-2 면역양성반응이 강하게 나타났다 (Fig. 6).

치수 노출 14일째가 되면 BMP-2 면역양성반응은 현저하게 감소하여, 치수 노출부위에 인접한 조직으로 국한되며 (Fig. 7), 치근부 치수에서의 BMP-2 면역반응도 7일째보다 약하게 나타나 점차 사라져가는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 8).

치수 노출 1일째 BMP-2 수용체 양성반응이 치수 노출부위에 인접한 치수에서 약하게 나타나기 시작하였다 (Fig. 9). 이 시기의 치근부 치수에서는 치관부 치수에서와 유사한 정도로 약하지만 BMP-2 수용체 면역양성반응이 나타났으며, 주로 큰 혈관 주변에서 발현되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 10).

치수 노출 3일째가 되면 BMP-2 수용체 양성반응이 치수 노출부위 인접부위에서 급격하게 증가하였으며, 치수 손상부위에서 멀어질수록 면역양성반응은 약해지는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 11). 이 시기의 치근부 치수에서는 1일째에 비해 조금 더 강한 면역반응을 보였으며, 혈관주변뿐 아니라 치근부 치수 전반에 걸쳐 BMP-2 수용체 면역양성반응을 보였다 (Fig. 12).

치수 노출 7일째에 BMP-2 수용체 면역양성반응은 최고치를 보여, 치수 노출부위에 인접한 모든 조직에서 강한 면역반응을 나타내었다 (Fig. 13). 이 시기의 치근부 치수에서는 BMP-2 수용체 면역양성반응이 약해지기 시작하였다 (Fig. 14).

치수 노출 14일이 되면 BMP-2 수용체 면역양성반응은 감소하여, 치수 노출부위에 인접한 부위로 국한되기 시작하였으며 (Fig. 15), 치근부 치수에서도 BMP-2 수용체 면역양성반응은 아주 약하게만 관찰되었다 (Fig. 16).

IV. 총괄 및 고안

치수는 치아에 영양을 공급하고, 감각과 면역에 있어서도 중요한 역할을 하며, 무엇보다도 발생과정중에 형성되는 일차 상아질뿐 아니라 일생에 걸쳐 이차 상아질을 형성하는 상아모세포를 포함하고 있는 매우 중요한 조직이다[1]. 따라서 치수가 손상받게 되면, 치수에 존재하는 치수 선조세포는 치수조직 자체의 재생 뿐 아니라, 상아모세포로 분화하여 수복상아질을 형성하게 된다.[12,13]. 이러한 치유과정중에 여러 성장인자들의 신호전달이 필수적인 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 transforming growth factor-beta (TGF-β), insulin-like growth factor-I (IGF-I), bone morphogenetic protein (BMP), fibroblast growth factor (FGF) 등이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[13,14].

본 연구에서는 흰쥐 상악 제1구치 치수를 노출시킨 후 1일, 3일, 7일 14일에 희생하여, BMP-2와 BMP-2 수용체의 면역염색을 통해 손상된 치수의 재생과정중 중요한 역할을 할 것으로 기대되는 이들 성장인자와 그 수용체의 위치의 변화를 밝히고자 하였다.

치수 노출 1일째 치관부 치수에서는 치수 노출부위에 인접한 건강한 조직의 세포들에서 강한 BMP-2 면역반응을 보였으며, BMP-2 면역반응은 치수 노출부위에서 멀어질수록 점점 약해져서, 치근부 치수에 이르러서는 면역반응이 거의 사라지는 것을 볼 수 있었다.

치수 노출 3일째 치관부 치수의 치수 노출부위 주변의 건강한 조직에서 전반적으로 강한 BMP-2 면역반응을 보였으며, 치근부 치수에서도 혈관 주변에 국한되어 강한 BMP-2 면역양성반응을 보였다. 혈관 주변은 성인 치수의 선조세포가 존재하는 부위로 여겨지는데, 이 부위에서 BMP-2의 활성이 강해지는 것은, 손상된 치수조직의 재생을 위해 혈관 주변의 세포가 빠르게 분열하기 위해 BMP-2를 필요로 하는 것으로 생각할 수 있다. 또한, 치근부 치수에서도 BMP-2 면역양성반응이 강하게 나타나는 것으로 보아, 손상된 치수 및 상아질을 수복하기 위해서는 노출된 치수 주변뿐 아니라 치수 노출부위에서 멀리 떨어져 있는 부분으로부터도 세포분열이 활성화되고, 이렇게 분열된 세포가 이주하여 재생과정에 참여하는 것으로 생각된다.

치수 노출 7일째가 되면 치관부 치수 전체에서 강한 BMP-2 면역양성반응을 보이며, 본 실험에서 관찰한 모든 시기를 비교할 때 가장 강한 면역양성반응을 보였으나, 치근부 치수에서는 여전히 혈관주변에만 국한되어 강한 면역염색반응을 나타내었다. 손상부위에 인접한 치관부 치수의 세포들은 세포분열과 세포분화과정 그리고 바탕질형성과 같은 치수조직 재생에 필요한 각 단계마다 BMP-2의 역할을 필요로 하는 것으로 생각되며, 치근부 치수에서는 BMP-2 면역양성반응이 혈관주변에만 국한되는 것으로 보아, 세포의 이주에 있어서는 BMP-2가 큰 역할을 하지 못하는 것으로 생각된다.

치수 노출 14일째가 되면 BMP-2 면역양성반응은 현저하게 감소하여, 치수 노출부위에 인접한 조직으로 국한되며, 치근부 치수에서의 BMP-2 면역반응도 약해진다.

한편, 치수 노출부위에 인접한 치관부 치수에서의 BMP-2 수용체의 면역염색반응은 BMP-2 면역염색반응과 대체로 일치하여, 노출 1일째 노출부위에 인접하여 국한되었던 BMP-2 수용체 면역양성반응은 시간이 지나면서 치관부 치수에 전반적으로 나타나서, 노출 7일이 되면 치관부 치수 전반에 걸쳐 강한 면역양성반응을 나타내다가, 노출 14일이 되면 치수 노출부위에 인접한 치수부위로 국한되어 면역양성반응이 감소하는 것을 볼 수 있었다.

하지만, 치근부 치수에 있어서는 BMP-2 면역염색 반응과 조금 달라서, 치수 노출 1일째부터 치근부 치수에서는 BMP-2 수용체에 대해 강한 면역양성반응을 나타내었다. 강한 면역염색반응은 노출 3일째까지 지속되다가 7일째가 되면 면역양성반응은 감소하였다. 1일과 3일째에 나타

나는 BMP-2 수용체에 대한 면역양성반응도 혈관주변에서 조금 더 강하게 나타나기는 했지만, 혈관주변에만 국한되어 있지 않아, BMP-2 면역양성반응과는 차이를 보였다.

이것으로 보아, BMP-2는 치수조직의 재생과정에서 세포의 분열과 치수에 존재하는 선조세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 치근부 치수에서 BMP-2 면역양성반응과 BMP-2 수용체의 면역양성반응 사이에 약간의 시간차이가 생기는 것에 대해서는 더 깊은 연구가 요구된다.

V. 결 론

노출된 흰쥐 치수조직의 치유과정중 bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)와 BMP-2 수용체의 역할을 알아보고자, 흰쥐 상악 제1구치 교합면 치수를 기계적으로 노출시키고, 노출 후 1, 3, 7, 14일에 희생하여 BMP-2와 BMP-2 수용체의 분포변화를 면역조직화학적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 노출된 부위에 인접한 치수조직에서 BMP-2 면역반응이 나타나기 시작하여, 노출 7일째에는 치관부 치수조직 전체에서 관찰되었다.
2. 치근부 치수에서는 노출 3일째부터 혈관주변에 국한되어 BMP-2 면역반응이 강하게 나타났다.
3. 노출된 부위에 인접한 치수조직에서 BMP-2 수용체의 면역반응의 시간에 따른 변화는 BMP-2와 유사하게 나타났다.
4. 치근부 치수에서의 BMP-2 수용체의 면역반응은 BMP-2와는 달리 치수 전반에 발현되었으며, 노출 7일째가 되면 급격하게 감소하였다.

이상의 결과로 보아, BMP-2와 BMP-2 수용체는 치수조직의 재생과정에서 세포의 분열과 치수에 존재하는 선조세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Nanci, A: Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed., p196, 2003.
2. Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Tompkins K, et al.: Bioactive molecules and the future of pulp therapy. Am J Dent, 16:66-76, 2003.
3. Urist MR: Bone formation by autoinduction. Science, 150: 893-899, 1965.
4. Aberg T, Wozney J, Thesleff I: Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. Dev Dyn, 210:383-396, 1997.
5. Takeda K, Oida S, Goseki M, Iimura T, Maruoka Y, Amagasa T, et al.: Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells. Bone, 15:467-470, 1994.
6. Nakashima M, Toyono T, Murakami T, Akamine A: Transforming growth factor-beta superfamily members expressed in rat incisor pulp. Arch Oral Biol, 43:745-751, 1998.
7. Nakashima M, Toyono T, Akamine A, Joyner A: Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFβ superfamily during mouse embryogenesis. Mech Dev, 80:185-189, 1999.
8. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I: Identifiaction of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. Cell, 75:45-58, 1993.
9. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH: Regulatory role of transforming growth factor-β, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. Dev Biol, 162:18-28, 1994.
10. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K: Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic proteins-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. J Endod, 30:205-208, 2004.
11. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A: Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. J Dent Res, 83:590-595, 2004.
12. Smith, AJ, Cassidy, M, Perry, H, Begue-Kirn, C, Ruch, JV, and Lesot, H.: Reactionary dentinogenesis, Int J Dev Biol, 39:273-280, 1995.
13. Smith, AJ, and Lesot, H: Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair?, Crit Rev Oral biol Med, 12:425-437, 2001.
14. Tziafas, D, Smith, AJ, and Lesot, H: Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. J Dent Res, 28:77-92, 2000.

Explanation of Figures

Fig. 1. Photomicrograph of the coronal pulp immunostained with anti-BMP-2 antibody 1 day after the pulp exposure. The immunoreactivity was strong in the coronal pulp adjascent to the exposed area (X 100).

Fig. 2. Photomicrograph of the radicular pulp immunostained with anti-BMP-2 antibody 1 day after the pulp exposure. The immunoreactivity was not detected in this area (X 100).

Fig. 3. Photomicrograph of the coronal pulp immunostained with anti-BMP-2 antibody 3 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was decreased gradually from the eposed dental pulp area (X 100).

Fig. 4. Photomicrograph of the radicular pulp immunostained with anti-BMP-2 antibody 3 days after the pulp exposure. The strong immunoreactivity was detected around the vessels (X 100).

Fig. 5. Photomicrograph of the coronal pulp immunostained with anti-BMP-2 antibody 7 days after the pulp exposure. The strongest immunoreactivity was detected (X 100).

Fig. 6. Photomicrograph of the radicular pulp immunostained with anti-BMP-2 antibody 7 days after the pulp exposure. The strong immunoreactivity was shown localized around the vessels (X 100).

Fig. 7. Photomicrograph of the coronal pulp immunostained with anti-BMP-2 antibody 14 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was decreased dramatically (X 100).

Fig. 8. Photomicrograph of the radicular pulp immunostained with anti-BMP-2 antibody 14 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was not detected (X 100).

Fig. 9. Photomicrograph of the coronal pulp immunostained with anti-BMP-2 receptor antibody 1 day after the pulp exposure. The immunoreactivity was strong in the coronal pulp adjacent to the exposed area (X 100).

Fig. 10. Photomicrograph of the radicular pulp immunostained with anti-BMP-2 receptor antibody 1 day after the pulp exposure. The immunoreactivity was strong in this area (X 100).

Fig. 11. Photomicrograph of the coronal pulp immunostained with anti-BMP-2 receptor antibody 3 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was decreased gradually from the eposed dental pulp area (X 100).

Fig. 12. Photomicrograph of the radicular pulp immunostained with anti-BMP-2 receptor antibody 3 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was strong in this area (X 100).

Fig. 13. Photomicrograph of the coronal pulp immunostained with anti-BMP-2 receptor antibody 7 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was strongest in this area (X 100).

Fig. 14. Photomicrograph of the radicular pulp immunostained with anti-BMP-2 receptor antibody 7 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was decreased dramatically (X 100).

Fig. 15. Photomicrograph of the coronal pulp immunostained with anti-BMP-2 receptor antibody 14 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was decreased (X 100).

Fig. 16. Photomicrograph of the radicular pulp immunostained with anti-BMP-2 receptor antibody 14 days after the pulp exposure. The immunoreactivity was not detected (X 100).

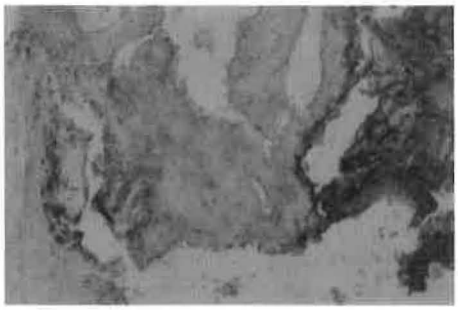

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

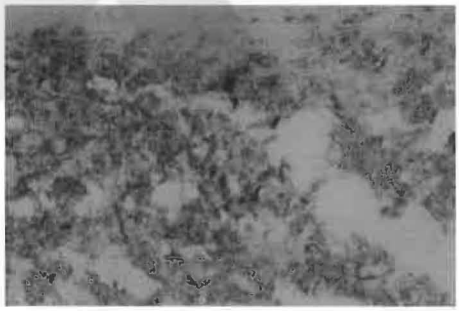

Fig. 5

Fig. 6

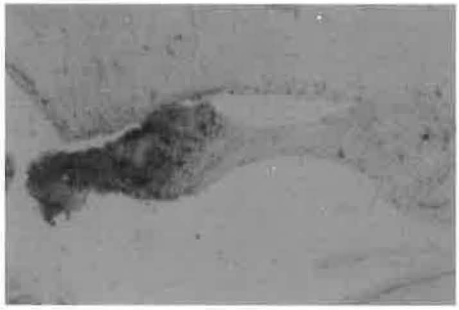

Fig. 7

Fig. 8

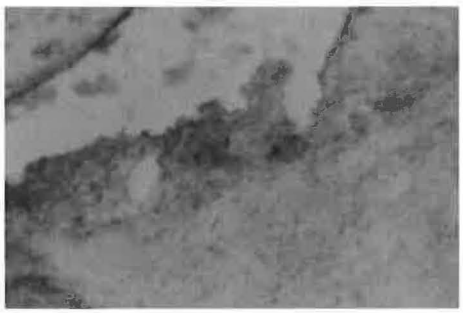

Fig. 9

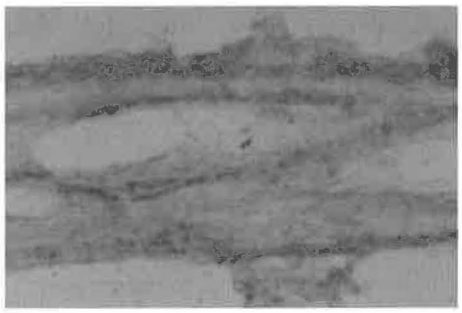

Fig. 10

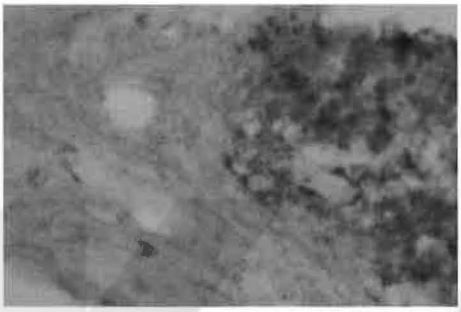

Fig. 11

Fig. 12

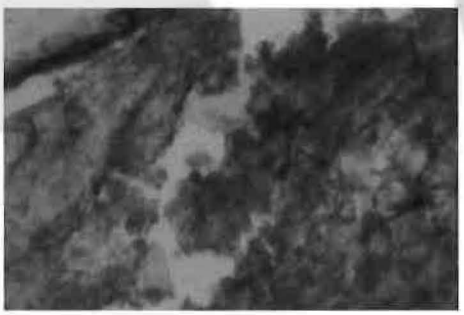

Fig. 13

Fig. 14

Fig. 15

Fig. 16

- ABSTRACT -

The Localization of BMP and BMP Receptor during the Exposed Dental Pulp Regeneration of the Rats

Sun-Young Park, Je-Won Shin, Seong-Suk Jue

Dept. of Oral Anatomy, School of Dentistry, Kyung Hee University

The purpose of the present study was to localize the bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-2 receptor during the regeneration of the mechanically exposed dental pulp of the rats. The pulp regeneration process was examined after 1, 3, 7, and 14 days of the dental pulp exposure of the rats by immunohistochemical method using anti-BMP-2 and anti-BMP-2 receptor antibodies.

The results were as follows:

1. The immunoreactivity of the BMP-2 was strong in the coronal pulp tissue adjacent to the exposed area.
2. The immunoreactivity of the BMP-2 was strong around the vessels in the radicular pulp tissue.
3. The immunoreactivity of the BMP-2 receptor in the coronal pulp tissue was very similar to that of BMP-2 in the intensity and the timecourse.
4. The immunoreactivity of the BMP-2 receptor was not limited around the vessels in the radicular pulp tissue.

These results suggest that the BMP-2 may have an important role during the regeneration of the injured dental pulp stimulating the proliferation and differentiation of the progenitor cells of the dental pulp.