

백서 치아발생에 락토페린이 미치는 영향

박희수, 김현진*

원광대학교 치과대학 구강해부학교실, 원광 생체재료 매식연구소

접수: 2015년 10월 12일 / 수정접수: 2015년 12월 8일 / 게재 승인: 2015년 12월 9일 / 출간: 2015년 12월 31일

중심어: 락토페린, 뼈재구성, 뼈과괴세포, 치아, 맹출과정

서론

최근 아이들의 면역과 성장에 대한 관심은 전 세계적으로 빠르게 증가하는 추세이다. 과거부터 우리나라에서 모유 수유는 생후 아이의 발육 및 건강을 위하여 중요한 과정으로 여겨져 오고 있다. 그러나 현대 여성들의 사회생활 증가로 인하여 직업을 가진 여성들이 점차적으로 증가함에 따라 모유 수유의 환경이 급속히 감소하는 추세이다. 시대적 사회 변화는 모유 성분과 거의 유사한 구성 성분으로 이루어진 분유 및 우유에 대한 요구를 증가시키고 있다. 이와 관련하여 모유에 함유되어 있는 성분 중의 하나로 알려진 락토페린의 여러 작용이 보고되면서 락토페린과 관련된 다양한 보고가 지속적으로 증가하고 있는 추세이다.

락토페린은 복수의 도메인으로 구성되어 있는 2개의 로브(lobe)로 된 금속 이온 결합성의 당단백질이며, 각 로브에는 철 이온과 결합하는 결합부위가 1개씩 존재한다¹⁻⁴⁾. 락토페린은 트랜스페린 패밀리의 단백질(transferrin family protein)의

하나이며, 같은 그룹으로는 혈청의 트랜스페린(transferrin)과 난백에 포함되어 있는 오보트랜스페린(ovotransferrin)이 있다. 보고에 의하면 락토페린은 미생물에 대한 정균작용⁵⁾, 살균작용⁶⁻⁸⁾, 증식작용^{9,10)}, 뼈조각 관련 작용¹¹⁻¹⁵⁾ 및 치주염 관련 작용^{16,17)} 등과 같은 다양한 분야에서 그 효과가 밝혀지고 있다.

뼈조각과 락토페린의 연구에서는 뼈의 형성 및 흡수를 조절하는 뼈모세포(osteoblast) 및 뼈과괴세포(osteoclast) 상호조절에 있어서 락토페린이 미치는 관련성을 보고하고 있다. 경조직인 뼈에서 락토페린은 파골세포분화를 억제시켜 골 형성을 도와주며, 골아세포에 있어서 동화인자로 작용하고, 골아세포를 활성화시키는 사이토카인으로써 골 형성 단백질과 염기성선 유아세포증식인자로 알려져 있다. 이와 같은 실험의 결과들은 락토페린이 뼈의 형성과정에서 골아세포의 분화를 증가시키고 파골세포의 분화는 억제한다는 것을 보여준다.

치아 발생은 형태적으로 싹시기, 모자시기, 종시기, 치관기로 분류되어지며 경조직을 형성하고 이후, 신경분포, 혈관형성을 이루며 구강내로 맹출되어 지며 기전으로는 4종류가 있다. 첫 번째는 치근 형성은 치근이 성장하면서 치아의 길이가 같

* 교신저자: 김현진.

전라북도 익산시 신용동 344-2

원광대학교 치과대학 구강해부학교실.

Tel : +82-63-850-6910, E-mail : khjin1005@wku.ac.kr

이 성장하는데 수직방향으로 맹출 되어지는 과정이고, 두 번째는 골 재형성으로 뼈 기질이 녹으면서 치아가 맹출 할 수 있는 길이 형성되어 맹출하는 것이며, 세 번째는 치아낭이 치아 씩에서 뼈를 녹이는 단백질을 분비해서 맹출하는 과정이다. 그리고 마지막으로 치주인대 형성으로 치아주위 인대가 형성되면서 잡아당기는 힘 때문에 맹출 되는 기전이다. 맹출 기전 중, 골 재형성은 치아 상방의 뼈 기질의 흡수를 통하여 맹출 하는 기전으로 락토페린이 맹출에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에서는 우유에서 분리 되어진 락토페린(Lactoferrin, Wako, JAPAN)을 사용하였고, 백서(Sprague-Dawley rat)를 약 2주일간 동물실 환경에 적응 시킨 후, 교배시켰다. 동물실의 환경은 쾌적하게 유지 시켰으며, 사료는 동물용 사료를 공급하였다. 백서가 태어난 날을 0일로 지정하였고, 10일에 희생 시켰다. 모든 실험은 원광대학교 동물 관리 및 사용위원회의 관리 절차를 승인 받았다. 본 연구에서는 EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid, Showa, JAPAN) 을, PBS(phosphate buffered saline, Rockford, IL, USA)제품을, Hematoxylin과 PFA(paraformaldehyde)는 Merk(Darmstadt, Germany)사 제품을, ethanol(EtOH)은 Daejung 제품을, xylene은 Ducksan제품을(Gyeonggi-do, Korea), paraffin은 McCORMIK REF사의 제품을, Canada balsam은 Santacruz(Dallas, Texas, USA)사 제품을 Eosin 과 N,N-Dimethyl

formamide, NAPHTHOLAS-MSPHOSPHATE, FASTRED VIOLET LB Salt 는 Sigma aldrich(Chicago, USA)사 제품을 사용하였다.

실험군 선정

실험 기간 동안 아무것도 투여 하지 않은 그룹을 음성대조군(naked control group, NC)으로, 물을 경구 투여한 그룹을 양성대조군(vehicle control group, CON), 락토페린을 경구 투여한 그룹을 실험군(experimental group, EXP)으로 설정 하였다 (n=5/each group).

물질 투여

각 군의 백서는 마취 없이 실험을 진행하였으며, 음성대조군 (NC)을 제외한 양성대조군(CON)과 실험군(EXP)에서는 존대를 사용하여 경구 투여 하였다. 실험군은 4 μ g, 6 μ g, 12 μ g, 16 μ g의 농도로 물에 희석된 락토페린을 경구 투여하였으며, 양성대조군(CON)에는 실험군(EXP)과 동일한 양 만큼의 물을 경구 투여하였다. 태어난 날부터 10일 동안 물질을 투여 하였으며, 10일에 희생하였다.

몸무게 측정

태어난 날부터 10일 동안 음성대조군(NC), 양성대조군(CON)과 실험군(EXP)의 어린 백서는 매일 몸무게를 저울(Mettler Toledo, Seoul, Korea)에 측정하여 기록했다.

결 과

몸무게 측정

백서의 무게는 생후 0일부터 출생 10일까지 매일 각 그룹별로 측정했다. 몸무게에 비례하여, 락토페린과 물은 12 μg 으로 먹였으며, 음성대조군(NC)은 아무것도 먹이지 않았다. 양성대조군(CON)에 비해서 실험군(EXP)은 증가하였다. 반면 물을 먹인 양성대조군(CON)은 실험군(EXP)에 비하여 몸무게가 감소하였으며, 실험군(EXP)의 몸무게가 양성대조군(CON)보다 증가하는 것으로 나타났다(그림 1).

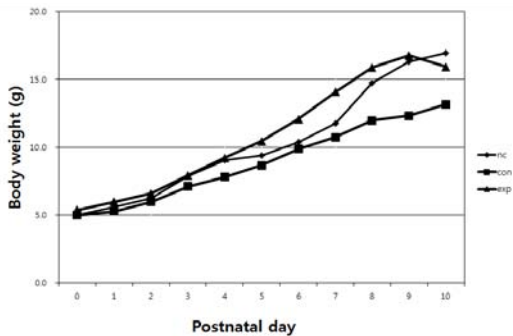


Figure 1. Change of body weight. The body weight (g) of rats was measured from the postnatal 0 day to the 10 days. The body weights in experimental group given with 12 μg lactoferrin per body weight.

생후 10일 치아 맹출 차이

출생 후 10일 동안 락토페린을 4, 6, 12, 16 μg 농도로 매일 몸무게에 비례하는 양으로 경구투여 하였다. 락토페린을 4 μg 과 6 μg 을 투여 했을 때, 음성대조군(NC)과 양성대조군(CON), 실험군(EXP)을 비교하였을 때, 치아 맹출에서 차이는 없었다. 반대로 락토페린을 12 μg 의 농도로 경구 투여했을 때 음성대조군(NC), 양성대조군(CON)

에 비하여 실험군(EXP)의 상악 앞니가 조금 더 빨리 맹출 되어짐을 육안으로 확인되었으며, 16 μg 을 경구 투여했을 때는, 실험군(EXP)에서 더 빠른 앞니 맹출 양상을 나타내었다(그림 2).

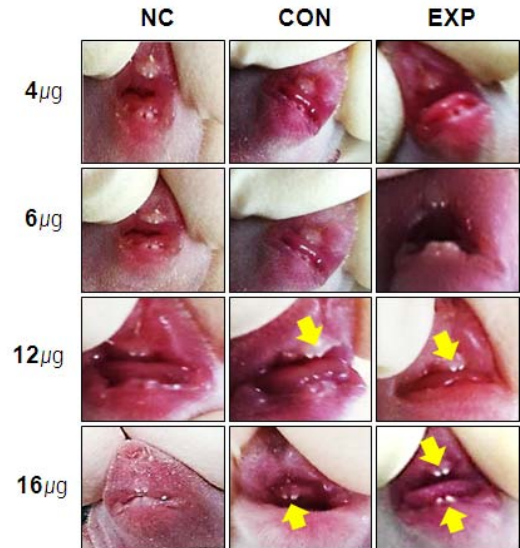


Figure 2. The change of tooth eruption. Daily of lactoferrin orally administered during postnatal 10 days. Photographs of teeth taken from rats treated with NC (naked control), CON (vehicle control), lactoferrin of EXP (experimental). Yellow arrow is one of 12 μg , two of arrow is 16 μg treated of lactoferrin (Photographs).

C: experimental group (40x), c: experimental group (100x)

고 찰

사람이 살아가는데 있어서 사춘기 전과 후로 나눠 보면, 뼈 성장은 빨랐다가 느려지며 뼈 손실이 발생한다²⁰⁾. 락토페린은 뼈 성장 과정의 호르몬 변화, 성장인자, 영양 등에 광범위하게 관여하며 체액, 초유, 우유에 매우 높은 농도로 존재한다²¹⁻²³⁾. 락토페린은 정균작용, 살균작용, 증식작용,

뼈 형성에 관한 작용, 치주염에 관한 작용 등과 같은 여러 분야에서 그 효과가 밝혀지고 있으며, 2008년에 일본에서 개최된 락토페린 포럼에서 발표된 연구 분야 분포를 분석한 결과 의학, 약학, 수의학 분야가 82% 를 차지하였고 식품계 연구실의 발표는 18% 였다. 이렇게 락토페린의 연구가 계속적으로 진행되고 있는 이유는 여전히 락토페린에 대해 밝혀야할 부분이 많이 존재하기 때문이라고 사료된다.

락토페린은 1939년 Sorense에 의해 우유에서 최초로 분리 되어졌고 사람 락토페린의 분자적인 구조와 아미노산의 서열은 1984년에 밝혀졌다²⁴⁾. 락토페린은 최초 발견 시 붉은색을 띠는 물질이었으며, 붉은색을 띠는 단백질이라는 의미에서 '붉은 단백질 (red protein)'이 라고 불렸다. 락토페린이 붉은 색을 가진 이유는 락토페린이 철과 결합함으로써 나타나는 것으로 철 이온과 결합하지 않은 락토페린은 무색이며 락토페린이 철과 결합하는 특징 때문에 생체 내에서 여러 가지 기능을 발휘하는 특성을 가지게 되었다. 락토페린은 분자량이 약 8 KDa 당단백질로서 2개의 로브 (lobe) 은행잎과 같은 나뭇잎이 겹쳐진 모양을 하고 있으며 각 로브에는 철 이온과 결합하는 결합부위가 1개씩 존재한다. 따라서 락토페린 1분자가 2개의 철 이온과 결합하게 되는 특징이 있다. 철 이온과 결합하는 락토페린의 결합력은 트랜스페린에 비해 약 260배 정도 강하다고 알려져 있으며 이러한 이유로 락토페린의 성질은 철의 수송이라는 의미보다는 철을 포획 (capture)하는 것에 그 본질적인 기능이 있다고 생각 된다.

하지만, 우리 몸에 아무리 유익한 단백질이라도 생체 내에 유입 되었을 때 변형이 일어나면 본래의 기능을 상실하게 된다. 락토페린이 우리의 몸 안에서 온전히 작용하기 위해서는 단백질의 형태적 변화 없이 흡수율이 높아야한다. 현재까지 알

려진 바로, 경구를 통해 섭취된 락토페린은 위에서 펩신 (pepsin)에 의해 소화되고 분해산물은 소장에도달한다고 알려져 있다. 따라서 장으로부터 흡수된 완전한 락토페린의 생리작용을 기대할 경우라면, 위에서 발생하는 소화현상에 대해 저항할 수 있어야 한다.

Nojima등(2007)과 Shiga등(2007)은 락토페린의 흡수효율을 높이기 위해 단백질 의약품 개발에 이용되고 있는 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 코팅(PEG) 화하는 기술을 적용하여 경구의약품으로 사용할 수 있도록 개발하였다. 이렇게 제작된 PEG화 락토페린 중 PEG-bLF은 철 흡수, 항염증활성, 소화효소내성, 동물을 이용한 장 흡수 및 혈중 안정성에서 PEG와 되지 않은 락토페린과 비슷한 능력을 가지고 있었지만, 소화효소에 대한 민감기는 두 배 이상 늘어난 결과를 보였으며, 장에서의 흡수율 역시 높게 측정되었다²⁵⁾. 따라서 락토페린과 같은 단백질은 섭취 횟수를 늘리는 것이 흡수율을 높이는 가장 좋은 방법이라고 사료된다. 이와 같이 락토페린이 신체에 전방위적으로 유익함을 가지고 있다고 계속해서 보고되고 있지만 치아 맹출에 관한 보고는 미비하다.

기본적으로 치아 발생은 형태적으로 싹시기, 모자시기, 종시기, 치관기로 분류되며 경조직을 형성하고 이후, 신경분포, 혈관형성을 이루며 구강 내로 맹출 된다. 맹출의 기전 중 뼈와 관련된 뼈재형성 기전을 토대로 실험을 진행하였다.

Jill Chornish 등(2004)은 경조직인 뼈에서 조골세포와 연골세포의 증식으로 인해 락토페린은 뼈 형성에 효과가 있다고 보고하였으며, Tuccari Giovanni 등(2010)은 락토페린이 성인보다 어린 샘플에서 더 많은 효과가 나타났다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 우유 성분 중 하나인 락토페린을 성인보다 더 많이 섭취하는 어린 아이들과 유사한 어린 백서를 모델로 정하여 실험을

시행하였다.

락토페린은 출생 10일 동안 4 μ g, 6 μ g, 12 μ g, 16 μ g 농도로 매일 몸무게에 비례하는 양으로 투여하였다. 락토페린을 4 μ g과 6 μ g으로 투여했을 때 음성대조군(NC)와 양성대조군(CON), 실험군(EXP)을 비교해 본 결과 차이는 없었다. 반대로 락토페린을 12 μ g과 16 μ g을 투여했을 때 실험군(EXP)에서 더 빠른 앞니 맹출 양상이 나타났다. 치아 상방의 뼈 기질 두께를 비교하기 위하여, 조직학적 분석인 H&E 염색을 시행하였다. H&E 염색에서 양성대조군(CON)에 비해 실험군(EXP)의 얇아진 뼈 기질층을 보여주었다. 또한 TRAP 염색에서 양성대조군(CON)에 비해 실험군의 파골세포 증가를 설명할 수 있으며, 강한 염색패턴을 보여줬다. 이전의 보고와는 달리 락토페린은 흥미롭게도 치아맹출 이동시 파골세포의 분화는 증가하였다. 이러한 결과를 확인하기 위해, 각 그룹의 대퇴골을 H&E 염색 및 TRAP 염색을 시행하였다. 양성대조군(CON)에 비하여 실험군(EXP)에서 일차골화과정(ossification)을 통하여 더 길어진 골간(diaphysis)의 양상을 관찰할 수 있었다. 더불어, 락토페린을 투여한 실험군(EXP)에서 골량(bone mass)이 증가되었으며, 파골세포 생성이 감소되는 양상이 나타났다. 락토페린 투여했을 때, 치아 맹출과 관련된 변화와는 다르게 기존의 보고와 같이 대퇴골의 정강뼈에서 뼈의 형성을 증가시키는 결과를 보여다.

2004년 Jill Chornish 등(2004)에 의해서 생물학적 효과는 몇 가지의 증거가 있지만 어른에게도 영향을 줄 수 있는지 알 수 없다고 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 어린백서의 성장에 락토페린이 치아맹출 관련하여 많은 영향을 주는 것으로 나타났다. 추후 어른 백서를 통한 락토페린의 영향도 연구 되어져야 한다고 사료된다.

이러한 락토페린은 뼈 성장의 생리적 역할뿐만

아니라, 치아 맹출에도 관여한다고 할 수 있으며, 본 실험 결과로 락토페린이 치아의 맹출 이동 시 골 재형성과 관련 있는 뼈 재흡수에 중요한 역할을 할 수 있다고 사료된다. 따라서, 치아의 맹출 이동 시 락토페린과 골 재형성(Bone remodeling)의 전체 기전을 이해하기 위해, 보다 더 자세한 분자적 기전 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Albar AH, Almehdar HA, Uversky VN, Redwan EM: Structural heterogeneity and multifunctionality of lactoferrin. *Curr Protein Pept Sci* 15: 778-797, 2014.
2. Vorland LH: Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS* 107: 971-981, 1999.
3. Legrand DI, Pierce A, Ellass E, Carpentier M, Mariller C, Mazurier J: Lactoferrin structure and functions. *Adv Exp Med Biol* 606: 163-194, 2008.
4. González-Chávez SA1, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents* 33: 301, 2009.
5. Nakamura I, Watanabe A, Tsunemitsu H, Lee NY, Kumura H, Shimazaki KI, Yagi Y: Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insect cells and its antimicrobial activity. *Protein Expr Purif* 21: 424-431, 2001.
6. Ellison, RT, Giehl TJ, LaForce FM: Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin a and trans-ferrin. *Infect Immun* 56: 2774-2781, 1988.
7. Van Berkel PH, Geerts ME, van veen HA, Mericskay M, de Boer HA, Nuijens JH: N-terminall stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for bindin to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem J* 328: 145-151, 1997.
8. Sallmann FR1, Baveye-Descamps S, Pattus F, Salmon V, Branza N, Spik G, Legrand D: Porins OmpC and PhoE of Escherichia coli as specific cell-surface targets of human lactoferrin. Binding characteristics and biological effects. *J Biol*

- Chem 274: 16107-16114, 1999.
9. Kim WS, Ohashi M, Tanaka T, Kumura H, Kim GY, Kwon IK, Goh JS, Shimazaki K: Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biometals* 17: 279-283, 2004.
 10. Rahman MM, Kim WS, Tanaka T, Kumura H, and Shimazaki, K: Lactoferrin effects on the growth of bifidobacteria. *Foods Food Ingrad J. Jpn* 211: 763-768, 2006.
 11. Cornish J: Lactoferrin promotes bone growth. *BioMetals* 17: 331-335, 2004.
 12. Cornish J, Callon KE, Naot D, Palmano KP, Banovic T, Bava U, Watson M, Lin JM, Tong PC, Chen Q, Chan VA, Reid HE, Fazzalari N, Baker HM, Baker EN, Haggarty NW, Grey AB, Reid IR: Lactoferrin Is a Potent Regulator of Bone Cell Activity and Increases Bone Formation in Vivo. *Endocrinology* 145: 4366-4374, 2004.
 13. Lorget F, Clough J, Oliveira M, Daury MC, Sabokbar A, Offorda E: Lactoferrin reduces in vitro osteoclast differentiation and resorbing activity. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 261-266, 2002.
 14. Vandrovcova M, Douglas TE, Heinemann S, Scharnweber D, Dubruel P, Bacakova L: Collagen-lactoferrin fibrillar coatings enhance osteoblast proliferation and differentiation. *J Biomed Mater Res A* 103: 525-533, 2015.
 15. Takayama Y, Mizumachi K: Effect of lactoferrin-embedded collagen membrane on osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells. *J Biosci Bioeng* 107: 191-195, 2009.
 16. Wakabayashi H, Kondo I, Kobayashi T, Yamuchi K, Toida T, Iwatsuki K, Yoshie H: Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. *Biometals* 23: 419-424, 2010.
 17. Berlutti F, Pilloni A, Pietropaoli M, Polimeni A, Valenti P: Lactoferrin and oral diseases: current status and perspective in periodontitis. *Ann Stomatol* 2: 10-18, 2011.
 18. Slavkin HC: Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation: a review. *J Craniofac Gen Dev Biol* 11: 338-349, 1991.
 19. Thesleff I: Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116: 1647-1648, 2003.
 20. Heshmati HM, Khosla S, Robins SP, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd, Riggs BL: Role of low levels of endogenous estrogen in regulation of bone resorption in late postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 17: 172-178, 2002.
 21. Lönnerdal B, Iyer S: Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 15: 93-110, 1995.
 22. Nagasawa T, Kiyosawa I, Kuwahara K: Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J Dairy Sci* 55: 1651-1659, 1972.
 23. Sánchez L, Aranda P, Pérez MD, Calvo M: Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369: 1005-1008, 1988.
 24. Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schontgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P: Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry* 145: 659-676, 1984.
 25. Takeuchi T, Kamemori N, Sugiyama A, Nojima Y, Sato A, Harada E, Shimizu H, Ando K: Gastro-intestinal transport of enteric-formulated lactoferrin into blood circulation via lymphatic pathway. *Lactoferrin* 118-122, 2007.

ABSTRACT**Effect of Lactoferrin on Tooth Development in Rats**

Hee-Su Park and Hyun-Jin Kim*

*Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Institute of Wonkwang Biomaterial and Implant,
Wonkwang University*

Among numerous studies related to lactoferrin, effect of lactoferrin involved with the bone formation have been recently noted. It was reported that lactoferrin increased the bone mass by enhancing the activity of the osteoblast as well as the proliferation of osteoblast and inhibiting the osteoclastic activity at the same time. In this study, we investigated the effect of lactoferrin during the tooth development in rats.

Rats were divided into 3 groups: naked control, water, and lactoferrin. Naked control (NC) was left untouched, whereas the vehicle control group was injected with water that is the same amount with lactoferrin solution. Lactoferrin was injected daily and the dosage increased gradually by 4, 6, 12 and 16 μg per body weight (g) during postnatal 10 days. In the experimental group injected with 4 and 6 μg of lactoferrin, there was no significant difference compare to NC or vehicle control. However, more incisor eruption was occurred in the experimental group injected with 12 and 16 μg of lactoferrin than that of NC or vehicle control. In order to elucidate the role of lactoferrin during the eruptive tooth movement, the further study will be needed.

Keywords: lactoferrin, bone remodeling, osteoclast, tooth, eruptive movement