

B-6. Dexamethasone에 의한 치주인대세포의 광물화 결절 형성

정하봉*, 이재목, 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론 및 목적

상실된 치주조직의 재생을 위해서는 치주인대세포가 골아세포성, 백악아세포성 혹은 기타 섬유아세포성 세포로 분화하는 것이 필요하다. 이중 골아세포로의 분화가 중요하며, 골아세포로 분화시의 특징은 갑상선 호르몬에 의한 cAMP 생산 증가, 골 Gla 단백질의 생산 증가, 광물화 결절의 생산, 알칼리성 인산효소(ALP)의 생산 등을 들 수 있다.

치주인대세포가 골아세포로 분화시 β -glycerophosphate(β -GP)만으로도 백서 치주인대 세포에서 결절 생성과 높은 알칼리성 인산효소 활성도를 보인다는 보고도 있고, β -GP첨가시 결절 생성이 없다는 보고도 있다. 또한, Dex는 용량의존적으로 부갑상선 호르몬 자극에 의한 cAMP 생산을 증가시키며, 알칼리성 인산효소의 활성과 Bone Sialoprotein, Osteocalcin의 발현도 증가시킨다는 보고도 있다.

본 연구의 목적은 치주조직 재생에 있어서 치주인대세포의 골아세포성 세포로의 분화를 관찰하며, Dex가 광물화에 미치는 영향과 농도에 따른 차이를 알아보고자 시행하였다. 또한 광물화 시 발현되는 여러 골기질 단백질 중 Matrix Gla Protein(MGP)의 발현양상도 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1) 치주인대세포의 분리, 배양

Dulbecco's modified Eagle medium을 생검배지로 준비했다. 교정치료를 목적으로 경북대학교 병원에 내원한 환자의 발거된 치아의 치주인대조직을 채취하고, 세절한 다음 35mm 배양접시에 고르게 분포시킨 후 배양했다. 이 실험에서는 3-7세대의 세포를 사용했다.

2) 실험군의 설정

10% FBS만을 투여한 군을 대조군으로, 투여군은 Dex양에 따라 아래처럼 분류했다.

- a) ascorbic acid(50 μ g/ml) & β -glycerophosphate(10mM)투여 (실험1군)
- b) ascorbic acid(50 μ g/ml), β -glycerophosphate(10mM) & DEX(100nM)투여 (실험2군)
- c) ascorbic acid(50 μ g/ml), β -glycerophosphate(10mM) & DEX(5 μ M)투여 (실험3군)

모든 군의 배양액은 2일마다 교환했다.

3) 광물화 관찰

광물화를 관찰하기 위해서 0, 1, 7, 14, 21일 째에 Alizarin-red S로 염색하고 light green SF yellowish 용액으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰했다.

4) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

각 조건에 따라 0, 1, 7, 14, 21일 동안 배양된 세포에서 RNA를 분리하였다. MGP 유전자의 발현을 알아보기 위하여 MGP primer는 upstream(5'-ATG AAG AGC CTG ATC CTT CTT-3')과 downstream(5'-TCA TTT GGT CCC TCG GCG CTT-3')의 배열이 되게 설계하였고, Internal control marker는 upstream과 downstream이 5'-GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT GGC-3', 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'의 배열을 가지는 GAPDH를 사용하였다. PCR 반응을 위해서 합성된 cDNA 2 μ 에 upstream과 downstream primer 각각 1 μ 씩과 10 \times PCR buffer 5 μ , 25mM MgCl₂ 3 μ , 10mM dNTP mix 1 μ , Taq DNA polymerase 0.5 μ , 소독된 물 36.5 μ 를 넣어 총 부피가 50 μ 되게 한 후 denaturation, annealing, extension과정을 시행하였다. PCR 생성물 10 μ 를 1.5 μ 의 loading buffer와 섞은 후 전기영동하여 비교하였다.

III. 결론

1) 시간 경과에 따른 세포형태의 변화 양상

치주인대세포는 실험군과 대조군 모두 초기에는 방추형 혹은 다각형의 단일층 형태에서 7일 경에는 세포의 크기와 수가 증가하여 복합층 형태로 변화했다. 그리고, ascorbic acid, β -GP와 Dex를 투여한 실험2, 3군에서는 14일경에 세포들의 방향성이 없어지고, 더욱 치밀해졌으며, 21일경에는 결절이 광물화되어 나타났다.

2) 광물화 결절의 형성

Alizarin-red S 염색 결과, 치주인대세포의 대조군과 실험1군(a.a와 β GP 투여군)에서는 광물화가 이루어지지 않았으나, 실험2, 3군(Dex 투여군)에서는 광물화 결절이 형성되었다. 그리고 치주인대세포의 광물화 결절 형성 정도는 Dex에 농도의존적으로 나타났다.

치은섬유아세포를 이용한 실험에서는 21일경에도 대조군과 실험군 모두에서 광물화 결절이 형성되지 않았다.

3) Alkaline phosphatase 활성도 관찰

ALP 활성도를 비교해보면 치주인대세포에서 0, 7일 경에는 활성도를 보이지 않았으며, 14일경에는 높은 활성도를 나타냈으며, 21일에도 비슷한 활성도를 유지하였다.

4) MGP 유전자 발현 양상

대조군과 실험군 모두에서 Matrix Gla Protein에 대한 유전자의 발현이 나타났으며, 모든 시점에서 발현은 유사하였다.