치은섬유아세포의 복제노화가 세포주기 조절에 미치는 영향

박영채 · 양대승 · 김재호 · 김현아 · 유용욱* · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실
*원광대학교 치과대학 구강생화학교실

I. 서론

치주조직은 치아를 지지하고 있는 조직으로 상피, 결합조직, 백악질, 골로 이루어졌으며, 노령화로 인한 노화변화를 겪게 된다. 이런 변화는 치주적으로 불리한 환경증가로 인한 염증에 의해서도 일어나지만 노화 그 자체에 의해서도 일어나게 된다. 노화에 따른 치주조직 자체의 변화는 상피에 경우, 각화 및 두께감소 등이 일어나며, 또한 rete peg의 두께도 감소하게 되는 것으로 알려져 있는데, 이로 인해 치주병원에 대한 저항력이 감소하게 된다[1]. 결합조직은 세포성분의 감소, 교원질 합성 감소가 일어나며, 구성하고 있는 섬유질의 배열도 좀더 불규칙적으로 변하게 된다. 또한 노화된 세포에 의하여 분비된 collagenase와 stomelysin 등의 효소와 사이토카인으로 인해 상피 기질과 기저막과 하부실질 등이 파괴된다[2-4]. 이런 일련의 과정에 의하여 만성 위축성 변화가 일어나게 된다[5].

치주조직은 세포성분과 비세포성분으로 이루어져있다. 치은의 세포성분 중 가장 많은 것은 섬유아세포이다. 치은조직의 손상이나 치주치료 후 치은섬유아세포는 유사분열을 통하여 증식하게 되며, 연조직의 치유를 완성한다. 하지만, 이런 치유과정도 노화될수록 억제되는 것으로 알려져 있으며, 이런 현상은 치은섬유아세포의 변화에 의하여 초래되는 것으로 사료된다.

무한 복제능을 가지고 있는 배아와 일부 종양세포를 제외하고는 대부분의 세포들은 배양계에서 제한된 수명을 가지고 있고, 이 제한된 수명에 이르게 되면 증식과 세포의 성장이 멈추게 된다. 이것을 세포노화 혹은 복제노화라고 하는데, 이런 현상은 처음 Hayflick과 Moorhead에 의하여 처음으로 연구되었고, 이 연구에서는 시험관 내 조건에서 섬유아세포는 항상 일정한 횟수의 세포분열 후에 더 이상 세포분열을 하지 못하고 세포분열이 정지한다는 연구결과를 발표하였다[6]. 그 후 복제노화에 대한 연구는 인간의 섬유아세포의 배양에서 30년 이상 연구되어져 오고 있으며[7-11], 또한 다양한 종에서의 많은 세포들에서도 섬유아세포와 같은 한정적 복제수명을 보여주고 있다[12]. Stanulis-Praeger B는 복제노화가 시험관 내에서 세포배양에 의한 인공산물이 아니라는 것을 밝혔고, 생체 내에서도 복제노화가 일어난다고 보고하였다[11].

복제노화의 가장 중요한 현상은 G1 주기에서 세포주기가 멈추고 더 이상 진행되지 않는다는 데에 있다. 세포가 이 단계에 이르게 되면 더 이상 DNA합성을 하지 않게 된다. 이런 노화현상

은 우성형질로서 젊은 세포와 노화세포를 융합한 세포도 노화의 표현형을 가지며, 또한 노화된 세포의 DNA를 추출하여 젊은 세포에 주입하면 DNA합성과 성장이 정지하게 되며[13], 세포주기를 활성화할 수 있는 생리적 분열촉진인자들도 세포를 S 주기로 이행시킬 수 없게 된다[14].

이런 세포의 복제노화와 세포주기의 정지는 매우 복잡한 과정을 통하여 일어난다. 이를 설명하기 위해서 많은 가설들이 제시되어져 오고 있다[15,16]. 이런 가설들은 두 가지 범주로 나눌 수 있다. 첫 번째는 여러 인자들이 세포내부와 외부의 분자들에 손상을 주며, 이런 손상된 분자들이 축적되어, 복제노화에 이르게 된다는 것이다. 이런 손상 가설의 대표적인 것이 반응기 산소의 발생으로 인한 단백질과 DNA 합성의 변성으로 세포와 조직에 손상이 축적되어 유발된다는 이론이다. 노화를 설명하는 두 번째 가설은 유전자발현의 프로그램설로 유전적 변화로 변형된 유전자 표현형이 축적됨에 따라 예정된 분열능의 상실을 초래한다는 것인데 현재 이 가설이 더 타당성 있는 것으로 받아들여지고 있다. 이런 복제노화를 조절하는 유전자들의 대부분은 세포주기 조절에 관여하는 유전자들로 알려져 있다.

세포주기의 진행과 정지에는 여러 세포주기 조절단백질이 복합적으로 관여한다는 것은 널리 알려진 사실이다. 세포주기의 진행에 있어서 RB단백질이 중요한 역할을 한다. RB단백질은 retinoblastoma gene의 산물로 retinoblastoma에서 처음 발견되었다[17]. RB는 인단백질로 인산화가 세포분열의 기능조절에서 결정적인 역할을 한다[18]. 이런 조절 작용은 RB에서 인산이 떨어지거나, 활성형태가 전사인자와 결합하게 되었을 때[19], RB의 기능이 불활성화되고 전사인자효소인 E2F는 유리되어 세포주기에 있어 DNA합성의 개시와 진행이 일어난다. 그러나, 세포분열을 하지 않는 섬유아세포에서 일반적으로 dephosphorylated form으로 존재하고 있으며, 분열활성인자들과 반응하게 되면 인산화된다[20]. RB의 인산화에는 cyclin과 cyclin dependent kinase(cdk)의 복합체가 관여하는데 이들은 RB를 인산화시켜 유전자 전사조절 단백질에 영향을 미치게 된다[21]. Cdk들은 각기 독특한 cyclin이라는 단백질과 결합하거나, 다른 효소에 의한 인산화, 그리고 세포주기 억제인자와의 상호작용에 의하여 그 활성이 조절된다[22]. 세포주기 억제인자는 cyclin - cdk 복합체와 결합하여 그 활성을 저해하는데 p16, p21, p27, p53 등을 들 수 있다. 이들은 정상적인 세포주기 조절에서 억제의 조절자로서 필수적인 역할을 한다. 세포의 복제노화는 이러한 세포주기 조절단백질의 발현변화로 일어나는 것으로 알려져 있다. 이런 억제의 조절자가 정상적으로 작용하지 못하게 되면, 세포는 불멸화되고 반복적인 증식을 통하여 종양화된다[23,24]. 세포주기 억제인자는 정상세포에서 DNA의 손상이 있거나, TGF -β와 같은 여러 인자에 의하여 활성화되고 세포주기를 정지시켜 세포를 G1 주기에 머무르게 된다. 이때 세포 내에서는 DNA의 수선과정이 진행되고 정상적으로 회복되면 세포주기 억제인자들은 제거되고 다시 S 주기로 세포주기는 진행하게 된다. 그러나, 복제노화된 세포의 경우에는 세포증식인자를 주입을 해도 G1 주기가 다시 S 주기로 진행되지 않는 비가역적인 변화가 일어난다.

최근 연구에 따르면 복제노화가 일어난 섬유아세포에서 세포주기 조절단백질의 발현변화가 보고되고 있으며, 섬유아세포의 기원에 따라 세포주기 조절단백질의 변화도 차이가 있었다. 사람의 폐에서 일차배양해서 분리해낸 섬유아세포의 복제노화세포에서는 p21과 p16 발현증가가 주요한 원인으로 pRB와 cyclin D_1 등은 큰 관계가 없는 것으로 보고된[25] 반면, 사람의 구강각화세포의 복제노화과정에는 주로 p16이 관련되어져 있다고 보고된 바 있다[26].

그러나, 치주조직에서 재생과 치유에 있어 중요한 역할을 담당하는 치은섬유아세포의 복제노화시 세포주기의 조절이 어떻게 조절되는지

는 그 자세한 기전은 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 치은섬유아세포의 복제노화에 따른 세포증식 및 세포주기의 변화를 관찰하고 세포주기 조절의 분자기전을 연구하기 위하여 세포주기조절 단백질의 발현을 관찰하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포 배양

치은섬유아세포는 치관길이 연장을 위해 내원한 건강한 21세 남성의 치간유두를 절제하여 얻은 조직으로부터 배양하여 얻었다. 절제된 조직은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco Co., USA)이 담겨있는 15 ml tube에 바로 옮겨 담아 혈액이나 이물질을 제거하기 위해 3회 세척을 시행한 후, 미생물 오염을 방지하기 위해 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco Co., USA)와 1% 항생제(Penicillin G 10,000 units/ml, Ampho - tericin B 25μg/ml, Gibco Co., USA)가 첨가된 DMEM이 들어 있는 100 ㎜ 조직배양접시에 옮겨 No. 15 blade를 사용하여 1 ㎟으로 세절하고, 60 ㎜ 배양접시에 5 6개 조각을 고르게 분포시켰다. 약 30분간 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 배양기에서 배양하여 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 배양접시에 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 DMEM 3 ml을 첨가하였다. 단일세포층이 형성될 때까지 2 3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 단층밀생이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후, 0.25% Trypsin/EDTA (Gibco Co., USA)를 이용하여 배양 접시에 부착된 세포를 분리시킨 후 다시 60 ㎜ 조직배양용 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 3일 간격으로 교환하였고 계대배양은 1:3 4의 비율로 시행하였다.

$$N = \frac{Cf}{Ci}$$

2. Population doubling level(PDL)의 측정

치은섬유아세포를 시험관내에서 배양하고 PDL 증가에 따른 복제노화를 관찰하였다. 정상 치은조직으로부터 분리한 치은조직을 배양접시의 표면적을 80 % 이상의 세포로 채워졌을 때까지 배양하고, 0.25% Trypsin/EDTA(Gibco Co., USA)으로 세포를 배양접시에서 분리시키고, 위상차현미경과 혈구계수기를 사용하여 세포수를 측정하였다. 일차 배양으로 얻는 치은섬유아세포는 다음 배양에 사용되었다. 이런 일련의 배양과정은 18계대까지 시행하였다. 치은섬유아세포의 PDL은 각각의 과정에서 다음의 공식으로 계산하였다[27].

$$\text{세포생존율} = \frac{\text{Trypan blue에 염색되지 않은 세포수}}{\text{수확한 전체 세포수}} \times 100$$

(N : Population doubing level, C*f* : 수확한 세포수, C*i* : 부착된 세포수)

3. 세포증식율과 세포생존율의 측정

복제노화가 치은섬유아세포의 세포증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 밀생에 도달한 PDL 27, PDL 41 및 PDL 58의 세포들을 0.25% Trypsin/EDTA로 분리해 내었다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6 - well plate에 5×10^4 개의 세포가 되도록 분주하였다. 2일군과 4일군으로 나누어 배양한 후 0.25% Trypsin/EDTA를 이용하여 배양접시에서 떼어내었다. 세포부유액 90 μℓ와 try - pan - blue 10 μℓ를 섞어 죽은 세포만을 염색시켰다. 위상차현미경과 혈구계수기를 이용하여 염색되지 않은 살아있는 세포수를 계산하여 세포증식율을 측정하였으며, 세포생존율은 죽은

세포수와 살아있는 세포수를 측정하여 아래의 공식을 이용하여 측정하였다.

4. 세포활성도의 측정

복제노화가 치은섬유아세포의 세포활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, PDL 27, PDL 41 및 PDL 58에서 80% 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% Trypsin/EDTA로 떼어내어 혈구계수기로 세포를 세어 24-well plate의 각 well당 1×10^4개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO^2, 100% 습도의 37℃ 배양기에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 교환하고, 2일군과 4일군으로 나누어 배양한 후, 생리 식염수로 용해한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma, USA) 용액 300 μℓ를 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200 μℓ의 DMSO(Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate 상으로 옮겨서 ELISA analyser(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포주기 분석

복제노화가 치은섬유아세포의 세포주기 조절에 미치는 영향을 평가하기 위하여, PDL 27, PDL 41 및 PDL 58에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 trypsinization하여 혈구계수기로 세포수를 측정한 다음 3×10^5 개의 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하고 70% ethanol로 고정시킨 후, RNase A(0.1 mg/ml)로 처리하여 RNA를 제거하였다. 50μg/ml의 propiodium iodide 용액으로 30분간 염색한 후 flow cytometer(Becton, Dickinson, Mountain View, CA)로 488 nm에서 propidium iodide-DNA complex에서 발생하는 형광을 측정하였다.

6. Western blot 분석

복제노화가 치은섬유아세포의 세포주기 조절 단백질의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여, PDL 27, PDL 41 및 PDL 58의 세포를 PBS로 2회 세척한 후, lysis buffer로 세포 단백질을 추출하고, BCA 용액(Bicinchoninic acid sol. Sigma, USA)에 Copper(Ⅱ) sulfate(Sigma, USA)를 50 : 1로 혼합하여 단백질 농도를 측정하였다. 각 실험군별로 추출된 단백질 50 μg을 사용하여 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 후 PVDF(Immobilon-P membrane, Milipore, USA)에 transfer하였다. 비특이항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 membrane을 각각의 blocking 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 다음과 같은 1차 항체들을 이용하여 60분 동안 반응시켰다. 1) cdk4(Santa Cruz, USA), 2) cyclin D_1(Santa Cruz, USA), 3) p21(Santa Cruz , USA), 4) p53(Oncogene science), 5) p16(Santa Cruz, USA), 6) RB(Santa Cruz, USA). 각각의 1차 항체로 반응시킨 후 blocking buffer로 2회 세척해 내고, anti-mouse와 anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugated secondary antibody(Santa Cruz, USA)로 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 1×PBS로 세척하였다. ECL(Amersham, UK)반응시키고 Hyperfilm-MP(Amersham, UK)에 노출시킨다. 사용된 단백질이 동일한 양인지를 확인하기 위하여 membrane을 1× Ponceau S 용액(Sigma, USA)에 염색한 후 발현 정도를 서로 비교하였다.

8. 통계분석

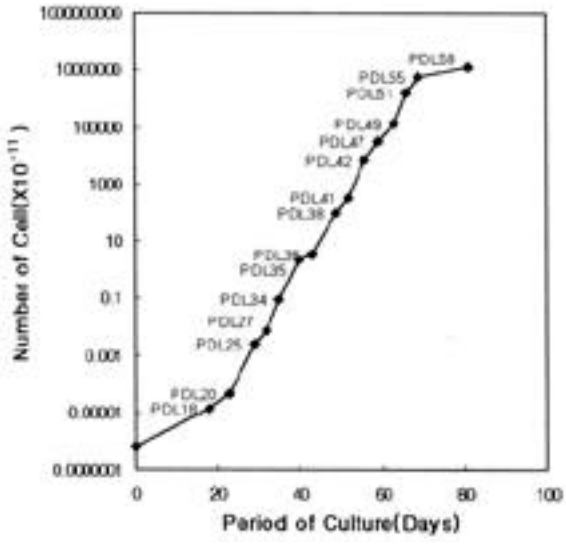

Figure 1. Population doubling level (PDL) of human gingival fibroblasts according to replicative senescence. The total cell numbers from the beginning to the end of each passage were used to determine PDLs, based on which cell proliferation curve was generated. The PDL numbers at which the cells were harvested are noted adjacent to the data points on the

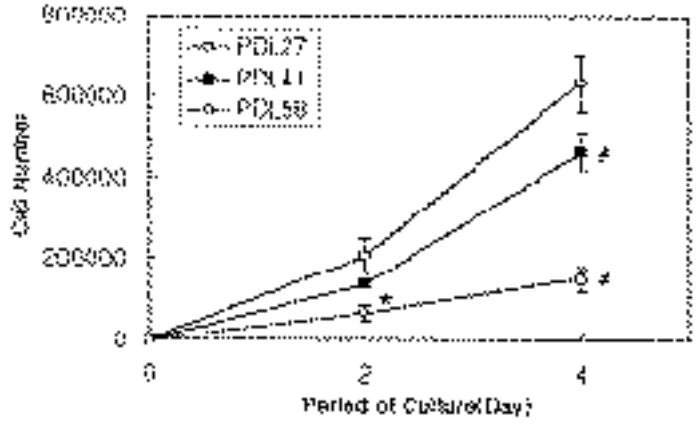

Figure 2. Proliferation of human gingival fibroblasts according to PDLs.
*** ; Significant difference compared to PDL 27 at 2 days (p<0.05)**
 # ; Significant difference compared to PDL 27 at 4 days (p<0.05)

실험결과의 분석은 SPSS WIN program을 사용하여 평균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법을 이용하여 처리하였다.

III. 연구결과

1. Population doubling level의 증가에 따른 복제노화

치은섬유아세포의 시험관 내 배양실험에서 population doubling level(PDL)의 증가에 따

Table 1. Cell viability of human gingival fibroblasts according to PDLs (% of control, Mean±S.D.)

Day	PDL27	PDL41	PDL58
2	65.61±4.44	63.41±4.93	56.08±12.42
4	79.59±1.16	75.29±3.32*	59.49±9.95*

* ; Significant difference compared to PDL 27 at 4 days($p<0.05$)

Table 2. Cell activity of human gingival fibroblasts according to PDLs (Mean±S.D.)

Day	PDL27	PDL41	PDL58
2	0.43±0.04	0.44±0.05	0.384±0.01
4	1.95±0.13	1.726±0.10*	0.5±0.02*

* ; Significant difference compared to PDL 27 at 4 days($p<0.05$)

른 복제노화를 관찰하였다. 치은섬유아세포가 PDL 증가에 따라 복제노화가 일어남을 관찰할 수 있었는데, PDL 58에서는 치은섬유아세포의 완전한 복제노화가 일어남을 관찰할 수 있었다 (Figure 1).

2. 복제노화에 따른 세포증식율과 세포생존율의 변화

치은섬유아세의 복제노화가 세포증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 PDL 27, PDL 41 및 PDL 58의 세포를 2일군과 4일군으로 나누어 분석한 결과 PDL이 증가할수록 증식율이 감소하였다. 배양 2일군에서 세 종류의 치은섬유아세포간에 유의성 있는 차이는 없었으나, 배양 4일군에서는 PDL 27에 비하여 PDL 41과 PDL 58이 유의성 있게 낮은 증식율을 보였다 (Figure 2).

세포생존율도 세포증식율과 유사하게 PDL이 증가함에 따라 감소하였다. 배양 2일군에서 세 종류의 치은섬유아세포간에 유의성 있는 차이는 없었으나, 배양 4일군에서는 PDL 27에 비하여 PDL 41과 PDL 58은 유의성 있게 낮은 세포생존율을 보였다(Table 1). 이러한 결과로 치은섬유아세포의 복제노화가 세포증식율과 세포생존율을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다.

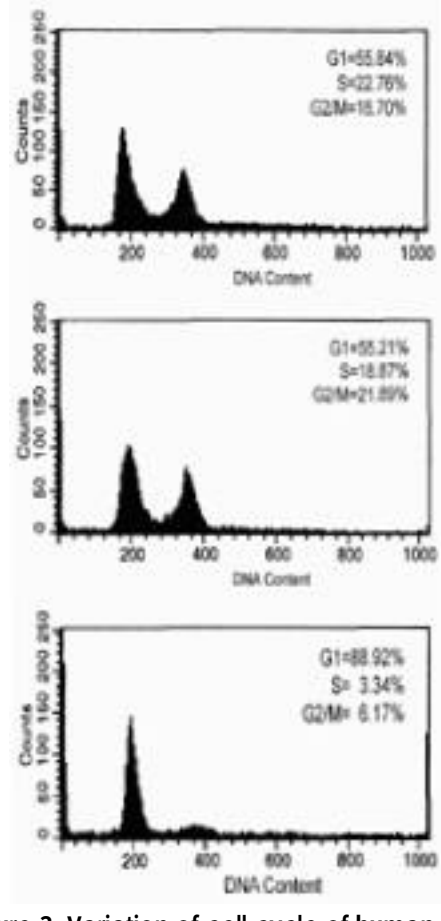

Figure 3. Variation of cell cycle of human gingival fibroblasts according to PDLs. Cells were cultured for 4 days (A: PDL 27, B: PDL 41, C: PDL 58).

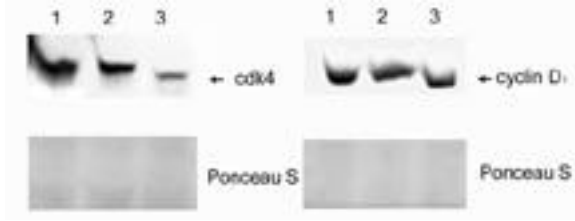

Figure 4. Western blot analysis for intracellular levels of cyclin D and cdk 4 in cultured human gingival fibroblasts(HGFs). Cell extract equivalent to 50 μg of total cellular protein of HGFs was electrophoresed by 15% SDS - PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of cyclin D1 and cdk4 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1×Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.(1 : PDL 27, 2 : PDL 41, 3 : PDL

Figure 5. Western blot analysis for intracellular levels of p53 and p21 in cultured human gingival fibroblasts(HGFs). Cell extract equivalent to 50 μg of total cellular protein of HGFs was electrophoresed by 15% SDS - PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of p53 and p21 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1×Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.(1 : PDL 27, 2 : PDL 41, 3 : PDL 58)

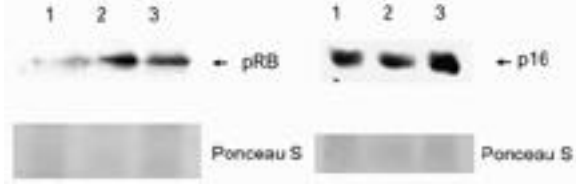

Figure 6. Western blot analysis for intracellular levels of pRB and p16 in cultured human gingival fibroblasts(HGFs). Cell extract equivalent to 50 μg of total cellular protein of HGFs was electrophoresed by 15% SDS - PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of pRB and p16 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1×Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.(1 : PDL 27, 2 : PDL 41, 3 : PDL 58)

3. 복제노화에 따른 세포활성도의 변화

복제노화가 치은섬유아세포의 세포활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 PDL 27, PDL 41 및 PDL 58의 세포를 2일군과 4일군으로 나누어 배양하고 MTT assay를 통하여 세포활성도를 측정한 결과 PDL이 증가할수록 세포활성도가 감소하였다. 배양 2일군에서 세 종류의 치은섬유아세포간에 유의성 있는 차이는 없었

으나, 배양 4일군에서는 PDL 27에 비하여 PDL 41과 PDL 58이 유의성 있게 낮은 세포활성도를 보였다. 이러한 결과로 치은섬유아세포의 복제노화가 세포활성을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다(Table 2).

4. 복제노화에 따른 세포주기의 변화

복제노화가 치은섬유아세포의 세포주기에 미치는 영향을 평가하기 위하여 PDL 27, PDL 41 및 PDL 58의 세포를 4일간 배양하여 세포주기를 flow cytometer로 분석한 결과 PDL이 증가할수록 S 주기와 G2/M 주기가 감소하였다. S 주기는 PDL 27이 22.76%로 가장 높았으며, PDL 58은 3.34%로 가장 낮았다. 이러한 결과로 치은섬유아세포의 복제노화가 세포주기 진행을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다(Figure 3).

7. 세포주기 조절단백질의 발현

1) Cyclin D1과 cdk4의 발현

PDL 27, PDL 41 및 PDL 58에서 cyclin D_1과 cdk4의 발현을 분석하기 위해 western blot analysis를 시행하였다. 세포주기에서 cyclin D_1과 cdk4는 복합체를 이루어 pRB를 인산화시켜 세포주기를 진행시키는 데, cyclin D_1은 PDL의 증가와 관계없이 일정한 발현을 보인 반면 cdk4는 PDL이 늘어날수록 발현이 감소하였다(Figure 4).

2) p53과 p21의 발현

PDL 27, PDL 41 및 PDL 58에서 p53과 p21의 발현을 분석하기 위해 western blot analysis를 시행하였다. PDL이 증가함에 따라 p53과 p21의 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 5).

3) pRB와 p16의 발현

PDL 27, PDL 41 및 PDL 58 의 pRB와 p16의 발현을 분석하기 위해 western blot analysis를 시행하였다. pRB는 인산화되어야 세포주기를 진행시키며, p16은 세포주기를 억제하는 세포주기 조절단백질이다. pRB와 p16 모두 PDL이 증가함에 따라 발현이 증가하였다(Figure 6).

IV. 총괄 및 고찰

구강영역에서의 노화는 신체의 다른 부분과 유사하게 진행되지만, 구강조직만의 특수한 형태적, 기능적 상실을 보인다. 여러 연구에서 노화가 진행될수록 치조골의 흡수, 저작상피의 케라틴 두께감소, 세포층의 감소 등을 야기하여 저작능율의 저하를 초래한다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 치주조직 중 치은을 구성하고 있는 치은섬유아세포의 복제노화에 따른 세포증식율, 세포생존율 및 세포활성도를 관찰하였고, 이런 노화에 의한 세포의 변화와 더불어 이에 따른 구강점막의 위축성변화에 복제노화가 어떤 역할을 하는가를 시험관 내에서 세포주기와 세포주기 조절단백질의 변화를 통하여 관찰하였다.

사람 이배체 섬유아세포(human diploid fibroblast)는 배양 초기에는 활발한 증식을 하다가 어느 한계점에 이르면 세포증식능이 소멸되고 그로 인해 시험관 내에서 제한된 수명을 갖는 것은 잘 알려져 있다[6]. 본 연구에서는 치은섬유아세포의 계대배양을 통하여 세포에 노화를 유도하였다. 복제가 진행될수록 치은섬유아세포의 증식율, 생존율 및 활성도는 감소하였다. 그러한 사실은 치은섬유아세포에 복제노화가 진행될수록 세포의 전반적인 생활력이 감소됨을 입증하여 주었다.

노화된 세포에서 보인 증식율의 현저한 감소와 세포고사된 세포의 증가를 생체 내의 현상과 관련시킨다면, 노화에 따라 치은을 구성하고 있는 세포성분의 감소는 특히 치은섬유아세포의 경우 본 연구에서 관찰된 것처럼 여러 기능이 저하되어 유발되는 것으로 생각될 수 있다.

또한, 생체 내에서 노화에 따른 치유능의 감소도 설명될 수 있을 것이다. 치은섬유아세포의 유사분열이 필요한 치주치료 후의 치유나 외상 후의 치유도 노화된 치은섬유아세포에서는 느려질 것이기 때문이다.

본 연구에서는 복제노화에 따른 치은섬유아세포의 세포주기변화를 관찰하였다. 치은섬유아세포의 유사분열을 통한 증식은 세포주기의 진행에 의하여 일어나며, 치주조직의 유지와 치유과정에 매우 중요하다. 세포주기는 분열에서 다음 분열까지 세포에서 일어나는 일련의 과정이며, M 주기, G1 주기, S주기, G2 주기의 4기로 나뉜다. 복제노화로 인한 치은섬유아세포의 세포주기 변화는 DNA를 합성하는 S 주기와 유사분열이 일어나는 M 주기가 감소한 반면, G1 주기는 증가하였다. 정상세포의 경우 G1 주기는 세포가 성장하고 DNA의 복제를 준비하는 기간이지만, 복제노화가 일어난 세포는 S 주기로 이행되지 않게 된다. 이 실험의 결과는 복제노화가 진행됨에 따라 치은섬유아세포는 G1에 머무르게 되는 것을 알 수 있었으며, 다른 섬유아세포를 이용한 실험결과와도 일치한다[14,28-30].

최근의 연구들로부터 특정 세포주기 조절단백질이 세포노화에 작용할 것이라고 보고되고 있다[31-35]. 본 연구에서는 세포주기 조절단백질 중 인산화효소인 cdk4와 cdk4와 결합하는 cyclin D_1, 그리고 세포주기의 진행을 억제하는 단백질인 p21, p53, p16, 마지막으로 전사인자인 E2F와 결합하여있는 pRB의 발현을 관찰하였다. 유사분열을 하기 위해서는 G1 주기에서 S주기로의 진행에는 전사유전자가 활성화되어야 한다. 이 전사유전자의 활성에는 여러 가지 세포주기 조절단백질이 관여하게 되는데 세포주기진행을 촉진하는 것과 억제하는 것으로 나눌 수 있다. 세포주기 조절단백질은 호르몬, 성장인자, cytokine 및 여러 가지 인자에 의하여 영향을 받아, 그 발현이 억제 혹은 증가하게 된다. cdk와 cyclin 복합체가 pRB를 인산화시키고 E2F는 유리되고 G1 주기에서 S 주기로 진행하게 된다. S 주기가 감소하였다는 것은 세포주기진행을 억제하는 세포주기 조절단백질의 발현 증가, 또는 세포주기진행을 촉진하는 세포주기 조절단백질의 발현 감소로 설명할 수 있다. 이 연구에서 인산화효소인 cdk4의 발현은 감소하였고, cdk4와 결합하여 활성을 조절하는 cyclin D_1의 발현은 변화가 없었다. 그리고, 세포주기진행을 억제하는 p16, p21, p53은 발현이 증가하였다.

p21과 p16은 각각 독립적으로 cdk4와 cyclin D 복합체의 활성을 억제한다. p21은 p53에 의존하여 그 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. p53의 증가는 DNA 변이를 초래하는 거의 모든 자극인자들에 의하여 유도되며 복제노화에 의해서도 일어난다[36-38]. 이 세포주기 억제자의 기능은 DNA의 손상이 유도되었을 때 일단 세포주기를 G1상태에 고정 시켜 DNA의 수선과 복구를 위한 시간적 여유를 갖기 위한 것으로 p21의 활성을 통하여 세포주기의 진행을 차단한다고 알려져 있다. 그러나, 최근 p53이 존재하지 않는 상태에서도 p21의 발현이 유도된다는 사실이 밝혀졌다[39,40]. 이 연구에서도 p21의 증가가 p53에 의존적인지 비의존적인지는 알 수 없었다. p16도 다른 이배체 섬유아세포의 노화연구에서 발현이 노화의 진행에 따라 증가한다고 알려져 있다[41-43].

본 연구에서도 복제노화로 인해 세포주기의 진행하는 억제하는 세포주기단백질의 발현이 증가하였으며 이로 인해 cdk4와 cyclin D 복합체의 활성이 감소되고, pRB의 cdk4와 cyclin D_1 복합체의 활성에 의한 인산화가 감소하였다. 이런 이런 현상과 더불어 노화된 세포에서는 RB는 항상 인산화되지 않은 형태로 존재하는 것으로 알려져 있어 복제노화에 의한 세포주기진행은 억제된다[21,44].

이 연구에서 많은 세포주기 조절단백질 중 일부의 발현만을 관찰하여 한계가 있으며, 앞으로 다른 세포주기 조절단백질의 변화에 대한 연구

도 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 시험관 내에서 치은섬유아세포의 복제노화가 세포주기진행을 억제하는 p21, p16, p53의 발현을 증가시키고, 세포주기진행에서 중요한 역할을 하는 인산화 효소 cdk4의 발현억제를 통하여 세포주기의 진행을 차단하였다.

본 연구 결과 치은섬유아세포에 대한 계대배양을 통하여 복제노화의 효과는 세포주기 조절단백질의 발현을 변화시켜, 세포주기진행을 억제하며, 이로 인해 세포의 증식, 활성도, 생존율 등을 감소시키는 것으로 사료된다. 앞으로 더 많은 세포주기 조절단백질에 대한 연구와 복제노화를 극복하기 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구는 치은섬유아세포의 복제노화가 세포에 어떤 영향을 미치는지를 PDL 27, PDL 41 및 PDL 58의 세포를 이용한 세포증식, 세포활성도, 세포주기분석과 세포주기 조절단백질의 발현을 분석을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포증식율과 세포생존율을 측정한 결과 PDL이 증가할수록 세포증식율과 세포생존율이 감소하였으며, 특히 배양 4일군에서는 PDL 27에 비하여 PDL 41과 PDL 58에서 세포증식율과 세포생존율의 유의한 감소를 보였다($p<0.05$).
2. 세포활성도를 측정한 결과 PDL이 증가할수록 세포활성도가 감소하였으며, 특히 배양 4일군에서는 PDL 27에 비하여 PDL 41과 PDL 58은 유의한 감소를 보였다($p<0.05$).
3. 세포주기를 분석한 결과 PDL이 증가할수록 S 주기와 G2/M주기는 감소하고, G1주기는 증가하는 경향을 보였다.
4. 세포주기 조절단백질의 발현을 분석한 결과 PDL이 증가함에 따라 cyclin D_1은 변화가 없었지만, cdk4의 발현은 감소하고, p53, p21, p16 및 pRB의 발현은 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과들로 치은섬유아세포의 복제노화가 세포의 세포주기 진행을 억제하며, 그 기전은 복제노화에 따른 cdk4의 발현감소와 p53, p21, pRB 및 p16의 발현증가가 일어남으로써 이루어지는 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Van der Velden U. : Effect of age on the periodontium. J. Clin. Periodontol. 11: 281 - 294, 1984.
2. West M.D., Pereira - Smith O.M., and Smith J.R. : Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. Exp. Cell. Res. 184: 138 - 137, 1989.
3. Millis A.J., Hoyle M., McCue H.M., and Martini H. : Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. Exp. Cell. Res. 201: 373 - 379, 1992.
4. Wick M., Burger C., and Brussel - bach S. : A novel member of human tis - sue inhibitor of metalloproteinases(TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation and senescence. J. Biol. Chem. 269: 18953 - 18960, 1994.
5. Breustedt A. : Age - induced changes in the oral mucosa and their therapeutic consequences. Int. Dent. J.

33: 272 - 280, 1983.
6. Hayflick L. and Moorhead P.S. : The serial cultivation of human diploid strains. Exp. Cell. Res. 25: 585 - 621, 1961.
7. Cristofalo V.J. and Pignolo R.J. : Replicative senescence of human fibroblast - like cells in culture. Physiol. Rev. 73: 617 - 638, 1993.
8. Raffetto J.D., Mendez M.V., Phillips T.J., Park H.Y., and Menzoian J.O. : The effect of passage number on fibroblast cellular senescence in patients with chronic venous insufficiency with and without ulcer. Am. J. Surg. 178: 107 - 112, 1999.
9. Hayflick L. : The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell. Res. 37: 614 - 636, 1965.
10. Wei W. and Sedivy J.M. : Differ - entiation between Senescence(M1) and Crisis(M2) in Human fibroblast Cultures. Exp. Cell. Res. 253: 519 - 522, 1999.
11. Stanulis - Praeger B. : Cellular senescence revisited: A review. Mech. Ageing. Dev. 38: 1 - 48, 1987.
12. Campisi J., Dimri G.P., and Hara E. : Control of replicative senescence. In: Handbook of the Biology of Aging. Schneider E, Rowe J, eds. New York: Academic Press, 1996, 121 - 146.
13. Norwood T.H., Pendergrass W.R., Sprague C.A., and Martin G.M. : Domi - nance of the senescent phenotype in heterokaryons between replicative and postreplicative human fibroblast - like cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71 :2231 - 2235, 1974.
14. Goldstein S. : Replicative senes - cence: The human fibroblast comes of age. Science 249: 1129 - 1133, 1990.
15. Thomas D.W. : Cellular senes - cence and cancer. J. Pathol. 187:100 - 111, 1999.
16. Jennings B.J., Ozanne S.E., and Hales C.N. : Nutrition, oxidative damage, telomere shortening, and cellular senes - cence: individual or connected agents of aging? Mol. Genet. Metab. 71: 32 - 42, 2000.
17. Lee W.H., Bookstein R., and Hong F. : Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. Science 235: 1394 - 1399, 1987.
18. Chen P.L., Scully P., and Shew J.Y. : Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. Cell 58: 1193 - 1198, 1989.
19. Flemington E.K., Speck S.H., and Kaelin W.G. : E2F - 1 - mediated trans - activation is inhibited by complex for - mation with the retinoblastoma suscep - tibility gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6914 - 6918, 1993.
20. Obeid L.M. and Venable M.E. : Signal transduction in cellular senes - cence. J. Am. Geriatr. Soc. 45: 361 - 366, 1997.
21. Stein G.H., Beeson M., and Gordon L., : Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senes - cent human fibroblasts. Science 249 :666 - 669, 1990.
22. Stein G.H., Drullinger L.F., and Rogetorye R.S. : Senescent cells fail to express cdc2, cdcA and cycB in

response to mitogen stimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 11012 - 11016, 1991.

23. Burkhart B.A., Alcorta D.A., Chiao C., Isaacs J.S., and Barrett J.C. : Two posttranscriptional pathways that regu - late p21 Cip1/Waf1/Sdi1 are identified by HPV16 - E6 interaction and correlate with life span and cellular senescence. Exp. Cell. Res. 247: 168 - 175, 1999.

24. Maher M.H., Weidong X., Denise J.S., Fu L., and Estela E.M. : Activation of a cAMP pathway and induction of melanogenesis correlatewith association of p16 INK4 and p27 KIP1 to CDKs, loss of E2F - binding activity, and premature senescence of human melanocytes. Exp. Cell. Res. 253: 561 - 572, 1999.

25. Zhu J., Woods D., McMahon M., and Bishop J.M. : Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. Genes. Dev. 12: 2997 - 3007, 1998.

26. Lee G., Park B.S., Han S.E., Oh J.E., You Y.O., Baek J.H., Kim G.S., and Min B.M. : Concurrence of replicative senescence and elevated expression of p16(INK4A) with subculture - induced but not calcium - induced differentiation in normal human oral keratinocytes. Arch. Oral. Biol. 45: 809 - 818, 2000

27. You Y.O., Lee G., and Min B.M. : Retinoic acid extends the in vitro life span of normal human oral keratinocytes by decreasing p16(INK4A) expression and maintaining telomerase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:268 - 274, 2000

28. Wang E., Lee M.J., and Pandey S. : Control of fibroblast senescence and activation of programmed cell death. J. Cell. Biochem. 54: 432 - 439, 1994.

29. Pittelkow M.R. and Shipley G.D. : Serum - free culture of normal human melanocytes: growth kinetics and

growth factor requirements. J. Cell. Physiol. 140: 565 - 576, 1989.
30. Gorman S.D. and Cristofalo V.J. : Analysis of the G1 arrest position of senescent WI38 cells by quinacrine dihydrochloride nuclear fluorescence. Evidence for a late G1 arrest. Exp. Cell. Res. 167: 87 - 94, 1986.
31. Pendergrass W., Angello J., and Norwood T.H. : The relationship between cell size, the activity of DNA polymerase alpha and proliferative activity in human diploid fibrob - last - like cell cultures. Exp. Gerontol. 24: 383 - 393, 1989.
32. Wistrom C. and Villeponteau B. : Cloning and expression of SAG: a novel marker of cellular senescence. Exp. Cell. Res. 199: 355 - 362, 1992.
33. Chang B.D., Watanabe K., Broude E.V., Fang J., Poole J.C., Kalinichenko T.V., and Roninson I.B. : Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age - related diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 4291 - 4296, 2000.
34. Gupta S. : Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. J. Clin. Immunol. 20 :229 - 239, 2000.
35. Campisi J. : Aging and cancer: the double - edged sword of replicative senescence. J. Am. Geriatr. Soc. 45 :482 - 488. 1997.
36. Atadja P., Wong H., Garkavtsev I., Veillette C., and Riabowol K. : Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 8348 - 8352, 1995.
37. Ling Y.H, Zou Y., and Perez - Soler R. : Induction of senescence - like phenotype and loss of paclitaxel sensitivity after wild - type p53 gene transfection of p53 - null human non - small cell lung cancer H358 cells. Anticancer Res. 20: 693 - 702, 2000.
38. Mary M.S., Wang Y., Rideout H.J., Ruth M. E., Chalmers R., and William G.T. : Reduced mitochondrial membrane potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53 - induced senescence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 261: 123 - 130, 1999.
39. Haapajarvi T., Kivinen L., Heiskanen A., des Bordes C., Datto M.B., Wang X.F., and Laiho M. : UV radiation is a transcriptional inducer of p21(Cip1/Waf1) cyclin - kinase inhibitor in a p53 - independent manner. Exp. Cell. Res. 248: 272 - 279, 1999.
40. Datto M.B., Li Y., Panus J.F., Howe D.J., Xiong Y., and Wang X.F. : Transforming growth factor beta induces the cyclin - dependent kinase inhibitor p21 through a p53 - independent mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 5545 - 5549, 1995.
41. Morisaki H., Ando A., Nagata Y., Pereira - Smith O., Smith J.R., Ikeda K., and Nakan - ishi M. : Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: roles of p16, p21, and cyclin D1. Exp. Cell. Res. 253: 503 - 510, 1990.
42. Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., and Dulic V. : Differential roles for cyclin - dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differenti - ation in human fibroblasts. Mol. Cell. Biol. 19: 2109 - 2117, 1990.

43. Alcorta D.A., Xiong Y., Phelps D., Hannon G., Beach D., and Barrett J.C. : Involvement of the cyclin - dependent kinase inhibitor p16(INK4a) in replica - tive senescence of normal human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci. USA. 93: 13742 - 13747, 1996.
44. Hirobumi M., Akikazu A., Yoshiho N., Olivia P.S., James R.S., Kyoji I., and Makoto N. : Complex mechanisms underlying impaired activation of cdk4 and cdk2 in replicative senescence: roles of p16, p21, and cyclin D_1. Exp. Cell. Res. 253: 503 - 510, 1999.

- Abstracts -

Effects of Replicative Senes - cence on the Cell Cycle Regulation in Human Gingival Fibrob - lasts

Young - Chae Park, Dae - Seung Yang, Jae - Ho Kim, Hyun - A Kim,
Yong - Ouk You*, Hyung - Keun You,
Hyung - Shik Shin

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University
*Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Wonkwang University

Gingival fibroblasts are major cellular component of gingiva. However, the mole - cular mechanisms of senescence of human gingival fibroblasts are unknown. Human fibroblasts undergo replicative senescence *in vitro* after a limited number of population doublings. A reduced rate of proliferation is a prominent phenomenon observed in senescent fibroblasts. This phenomenon is happened with cell cycle arrest that was controled by cell cycle regulatory proteins. The purpose of present study was to investigate the effect of replicative senes - cence on cell cycle progression and to find out its molecular mechanisms in human gingival fibroblasts. Replicative senescence of gingival fibroblasts were induced by subsequent cultures that were repeated up to 18 passage. In the present study, I examined change of cell proliferation, cell activity, cell viability and cell cycle pro - gression during the replicative process. Also, I examined expression of cell cycle regulatory proteins which was estimated by western blot analysis.

Cell proliferation, cell activity and cell viability of gingival fibroblasts were notably decreased with increase of population dou - bling level(PDL). S phase was decreased and G1 phase was increased with increase of PDL. Western blot analysis showed that levels of p16, p21 and p53 of senescent gingival fibroblasts(PDL41, PDL58) were higher than young fibroblasts(PDL27) and cdk4 were lower than young fibroblasts(PDL27).

In conclusion, these results suggest that proliferative function of human gingival fibroblasts may be decreased by replicative senescence and its molecular mechanisms may be activatied with p16, p21, p53 and pRB, and repressed wtih cdk4.