

IL-1 β , PDGF-BB 그리고 TGF- β 가 사람 배양 치주인대 섬유모세포의 PDLs17 mRNA의 발현에 미치는 영향

임기정 · 한경운 · 김병욱 · 염창엽 · 박주철*

조선대학교 치과대학 치주과학교실

*조선대학교 치과대학 조직학교실

I. 서론

치주인대 (periodontal ligament)는 치아와 치조골 사이에 위치하여 치아를 악골에 부착 지지하며, 저작력과 같은 다양한 방향의 기계적 스트레스 (mechanical stress)에 저항하고, 또한 감각기능을 하는 고도로 분화된 세포성 결합조직이다¹⁾. 치주인대의 세포성분은 섬유모세포, 골모세포, 파골세포, 대식세포, Malassez 상피세포, 미분화간엽세포, 모세혈관세포 및 백악모세포 등의 다양한 세포들로 구성되어 있다^{2, 3, 4)}. 치주인대의 형성과정은 Hertwig 상피근초를 구성하는 내외치세포가 있는 상황에서 외배엽성 간엽 기원의 미분화간엽세포가 분화하여 치주인대섬유모세포를 만들고 이 세포에 의하여 치주인대가 형성되는 것으로 요약 할 수 있으나, 미분화간엽세포에서 치주인대 섬유모세포가 분화하는 과정에 관하여는 잘 알려져 있지 않으며 특히 그 분자생물학적 기전에 관하여는 연구가 더욱 미미한 실정이다.

최근의 몇몇 연구에 의하면 치주인대에 존재하는 세포들에서 특징적으로 발현되는 유전자들로 S100A4와 S100A2로 구성된 칼슘결합단백 및 최초 발현시에는 osteoblast-specific factor 2로 보고된

periostin등이 알려져 있다⁵⁾. S100A4와 S100A2는 소의 치주 조직에서 분리되었는데, 그 중 S100A2는 치주인대 뿐만 아니라 치은에서도 존재하는 것으로 밝혀져 치주인대의 발생과 분화와 관련하여 치주인대에서 특이적인 기능을 기대 할 수 없게 되었고, S100A4는 치은에 비하여 치주인대에서 선택적으로 발현되나 배양 골수세포나 치주인대세포에 S100A4를 투여하면 석회화 소결질의 형성이 억제되는 것으로 알려졌다⁶⁾. 따라서 S100A4는 치주인대 섬유모세포의 초기 발생이나 분화에 관여하기보다는 치주인대 형성 후에 치주인대의 석회화를 방해하여 치주인대의 폭경을 유지하는 것으로 생각되고 있다. 한편, 골모세포주인 MC3T3E1 세포주에서 골모세포에 특이한 인자로 최초 분리된 페리오스틴은 골막과 치주인대에 조직 특이적으로 발현되며 그 발현이 TGF- β 에 의해 조절된다고 알려져 있으나⁷⁾, 골막에서는 골형성 초기에 골모세포를 모여들게 하고 부착하는데 관여하며 치주인대에서도 치주인대에 존재하는 골모세포들의 발생과 분화과정에 관여하는 것으로 생각할 수 있다. 결국 현재까지 치주인대섬유모세포의 분화나 발생에 선택적으로 관여하는 유전자에 관한 연구는 미미한 실정이다.

치주조직을 구성하는 치은의 섬유모세포와 치주인

대의 섬유모세포는 인접하게 위치하며 같은 섬유모세포군에 속하지만 그 발생학적 기원이 다르다^{8, 9, 10, 11, 12}. 작은 섬유모세포는 주로 작은 결합조직을 유지하는 데 관여하는 반면, 치주인대 섬유모세포는 그 특유 기능으로 치주인대를 형성할 뿐만 아니라 생체 내에서의 인접 치조골 및 시멘트질의 수복과 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다^{13, 14, 15, 16, 17}. 또한 치주인대 섬유모세포는 동종의 세포만으로 구성된 것이 아니라 표현형과 기능이 상이한 여러 아개체 (sub-population)의 세포로 이루어져 있다^{18, 19, 20, 21}. 나아가, 이들 세포는 높은 알칼리성 인산분해효소 활성, 부갑상선 호르몬에 대한 반응성, 골유사 기질 폴리펩타이드의 생산 및 석회화된(mineralized) 소결절의 형성과 같은 골모세포(osteoblast)의 표현형들을 발현하기도 하는 등 그 특성에서도 작은 섬유모세포와 많은 차이점을 나타낸다^{22, 23, 24, 25, 26, 27}.

최근에 Park 등²⁸은 치주조직의 재생을 유도할 수 있는 분화유도 인자를 연구함에 있어, 일반 결합조직의 섬유모세포인 작은 섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포가 선택적으로 발현하는 유전자가 치주인대의 발생과 분화과정에 중요한 역할을 할 수 있다는 논리를 바탕으로 배양 작은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포사이의 유전자들을 subtraction 방법으로 비교하여 PDLs17을 포함한 5개의 후보유전자가 작은 섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포에 선택적으로 발현되며 그 중에서도 특히 PDLs17은 그 단백질 구조나 기능이 밝혀지지 않은 새로운 유전자로 치주인대 섬유모세포의 분화과정에서 그 역할이 기대됨을 보고하였다.

본 연구에서는 치주인대 섬유모세포-특이 유전자로 알려진 PDLs17 단백질의 분포를 다클론성 항체 제작과 면역조직화학적 염색을 통하여 확인하고, 또한 치주인대세포들의 성숙 및 증식에 관여하는 인자들로 알려진 IL-1, PDGF-BB 및 TGF- β 등의 투여가 배양 치주인대 섬유모세포에서 PDLs17 유전자의 발현에 어떤 영향을 미치는지를 알아봄으로써 PDLs17 유전자의 치주인대 세포의 재생과 분화와 관련한 역할을 규명하는데 있다.

II. 연구재료 및 방법

가. 사람 치주인대 섬유모세포의 일차배양

치주조직이 건강한 사람의 제3대구치의 치근 중간 1/3에서 얻은 조직들을 무균상태에서 항생제가 함유된 Hank's Balanced Salt Solution (Gibco BRL) 용액으로 수회 세척한 후 해부현미경하에서 1-2mm³ 정도의 크기로 자른 다음, 10% 열 불활성화된 소태아 혈청 (Gibco BRL) 및 항생제(페니실린 100 U/ml, 스트렙토마이신 100 μ g/ml, 젠타마이신 50 μ g/ml) 및 핑지존 2.5 μ g/ml가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (Gibco BRL)을 이용하여 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 상태의 세포배양기에서 일차배양하였다. 일차배양된 세포들을 계대배양하여 제2세대의 세포들을 실험에 이용하였다.

나. 배양 치주인대 섬유모세포의 IL-1 β , PDGF-BB 및 TGF- β 처리

1) 배양세포에 IL-1 β , PDGF-BB 및 TGF- β 를 48시간 처리 후 세포에서 total RNA 추출
일차배양된 세포를 4-well 세포배양기에 계대배양하여 세포가 세포배양기 면적의 70-80%에 이를 정도로 증식하면 사람 재조합 IL-1 β (Immunex Corporation, USA)를 25 pg/ml 및 50 pg/ml, 재조합 사람 PDGF-BB (R&D systems, USA)를 1 ng/ml 및 10 ng/ml, 사람 재조합 TGF- β (R&D systems, USA)를 1 ng/ml 및 20 ng/ml의 농도로 투여하여 48시간 동안 더 배양한 후 각각의 세포에서 SV total RNA Isolation System (Promega, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 total RNA를 추출하였다.

2) 배양세포에 IL-1 β , PDGF-BB 및 TGF- β 를 2주간 처리한 후 total RNA 추출
세포가 세포배양기 면적의 70-80%에 이를 정도로 증식하면 재조합 사람 IL-1 β (Immunex Corporation, USA)를 25 pg/ml 및 50 pg/ml, 재조합 사람 PDGF

Table 1. Oligonucleotide primers used in the PCR amplification of human PDLs17 and G3PDH.

Primer	Gene (expected size)	Primer sequence
17sEcoI 17asBHI	PDLs17 (726bp)	5' primer: 5'-ATGGAAGTATTATTATTAGAAA-3' 3' primer: 5'-ACCTTTCAAACATGGAGTAA-3'
hG3PDH	G3PDH (300bp)	5' primer: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 3' primer: 5'-TCCACCACCCTGTTGCGTA-3'

(R&D systems, USA)를 1 ng/ml 및 10 ng/ml, 사람 재조합 TGF- β (R&D systems, USA)를 1 ng/ml 및 20 ng/ml의 농도로 배양액 교환 즉 이틀에 한번씩 투여하여 2주간 더 배양하였다. 배양 2주 후 각각의 세포에서 RNA를 추출하였다.

다. RT-PCR (Reverse Transcription PCR)을 이용한 IL-1 β , PDGF-BB 및 TGF- β 등의 성장인자 투여가 PDLs17 유전자 발현에 미치는 영향 확인

각 RNA 샘플을 Avian Myeloblastosis Virus에서 얻은 역전사효소 (Life Sciences, USA) 15U를 사용하여 역전사시켰다. 역전사된 cDNA와 PDLs17의 단백질 암호화 영역(Protein Coding Region)의 726bp (242 아미노산)에 해당하는 특이적 프라이머와 대조군으로 G3PDH의 프라이머 (Table 1)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다.

PCR 조건은 95°C에서 1분, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분간의 사이클을 30회 실시하였다. PCR 생성물을 1.5% 아가로스겔 상에서 전기영동하여 PDLs17 및 G3PDH 유전자의 발현을 확인하였다.

분리된 PDLs17 단백질 암호화영역의 유전자 단편들을 pGEM-Teasy Vector Systems (Promega, USA)을 이용하여 subcloning하고 자동 염기서열 분석기 (ABI 310, Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하여 PDLs17 유전자 즉 Human Hypothetical Protein

FLJ10895 mRNA로 보고된 염기서열의 단백질 암호화 영역과 동일하지 확인하였다.

라. 면역조직화학적 염색을 위한 PDLs17 단백질에 대한 항체의 제작

사람 PDLs17의 폴리펩타이드 영역에서 항체제작을 용이하게 하기 위하여 친수 영역인 올리고펩타이드 CLSVSYNRSYQINE 및 SEAVHETDLHDGC을 주문 합성하였다. 올리고펩타이드들은 자동 펩타이드 합성기 (모델 430; Applied Biosystems)의 보조하에 고상 절차를 사용하여 화학적으로 합성하였다. 합성 펩타이드를 MBS 커플링 방법에 의해 셀프히드릴기를 통해 담체 폴리펩타이드인 KLH (Keyhde Limpet Hemocyanin)에 접합시켰다. 1 ml의 완전 프로인트 보조제 (complete Freund's adjuvant)를 이용하여 KLH에 접합시킨 합성 펩타이드 항원용액 (100 μ g/ml)을 안정하게 부유화시킨 후 토끼 림프 결절에 주입하여 1차 면역시켰다. 3주후 100 μ g/ml의 항원으로 2차 면역후 다시 10일 후 50 μ g/ml의 항원 용액으로 3차 면역시켰다. 10일 후 귀의 이면 중추 동맥에서 채혈하여 얻은 다클론 항혈청은 CNBr-Sephrose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 친화성 정제 (Peptron, Korea)하였다.

마. 면역조직화학적 염색

조직절편 제작을 위해 생후 30일된 생쥐를 4% paraformaldehyde 용액으로 관류고정 후 4°C, 4% paraformaldehyde 용액에서 다시 16시간 고정된 후 PBS (Phosphate Buffer Saline) 용액으로 2시간 세척하고, 10% EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) 용액에서 2주-4주간 탈회하였다. 통법에 따라 파라핀 포매 하고 5 μ m 두께로 절편을 제작하여

ethoxysilran-coated 슬라이드에 붙인 하악골 단편을 면역조직화학적 염색에 이용하였다. 이 절편을 1% BSA (Bovine Serum Albumin)가 함유된 PBS 용액을 사용하여 30분 동안 예비 항은 처리한 뒤, PBS 중의 1% BSA로 1:100의 비율로 희석한 항 PDLs17 항혈청과 1시간 동안 항은 처리하였다. PBS로 세척한 후, 단편을 2차 항체로서 PBS에 1:200의 비율로 희석한 염소 항토끼 IgG 항체 (Vector Lab, USA)와 실온에서 1시간 동안 항은 처리하였다. PBS로 순간 세정한 후, 단편을 PBS 중의 ABC 시약 (Vector Lab, USA)과 1시간 동안 반응시켰다. 0.05% DAB (Deomino-benzidine Tetrahydrochloride)를 이용한 비색 반응으로 발색시킨 후, 단편을 세척하고 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

III. 연구결과

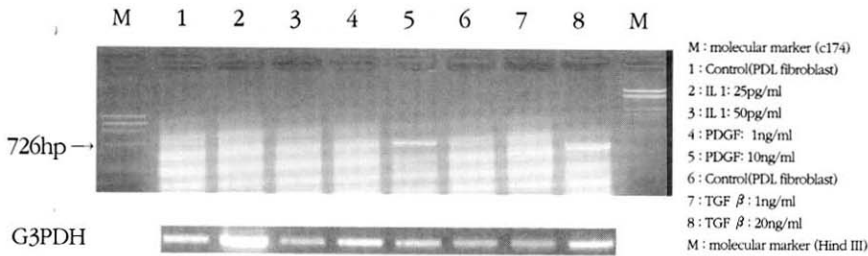


Figure 1. Expression of PDLs17 mRNA by human PDL fibroblasts in response to human recombinant IL-1, PDGF-BB and TGF- β treatment for 48 hours analyzed by RT-PCR. G3PDH used as a control.

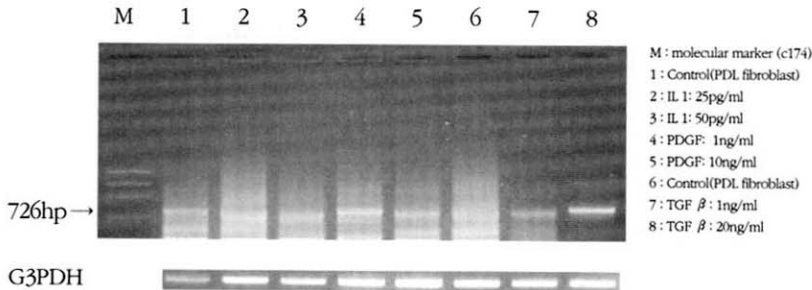


Figure 2. Expression of PDLs17 mRNA by human PDL fibroblasts in response to human recombinant IL-1, PDGF-BB and TGF- β treatment for 2 weeks analyzed by RT-PCR. G3PDH used as a control.

가. IL-1, PDGF-BB 및 TGF- β 등의 성장인자에 대한 PDLs17 유전자의 발현 변화

- 1) 재조합 사람 IL-1 β 를 25 pg/ml 및 50 pg/ml, 재조합 사람 PDGF-BB를 1 ng/ml 및 10 ng/ml, 사람 재조합 TGF- β 를 1 ng/ml 및 20 ng/ml의 농도로 투여하여 48시간 동안 더 배양한 후 치주인대 섬유모세포에서 PDLs17 유전자의 발현 양상을 확인한 결과 PDGF-BB를 10ng TGF- β 를 20ng 처리한 군에서 PDLs17의 발현이 증가된 소견이 관찰되었다 그러나 IL-1 β 를 처리한 군에서는 PDLs17 발현의 변화가 나타나지 않았다 (Fig 1).
- 2) 재조합 사람 IL-1 β 를 25 pg/ml 및 50 pg/ml, 재조합 사람 PDGF-BB를 1 ng/ml 및 10 ng/ml, 사람 재조합 TGF- β 를 1 ng/ml 및 20 ng/ml의 농

도로 2주간 지속적으로 투여 한 후 PDLs17 유전자의 발현 양상을 확인한 결과 TGF-β를 20ng의 농도로 지속 투여한 군에서 발현이 증가된 양상으로 나타났다 (Fig 2).

나. PCR을 통하여 얻은 유전자 단편들의 염기서열과 database상의 PDLs17 유전자의 염기서열 확인

RT-PCR을 통하여 얻은 PDLs17의 ORF(Open Reading Frame)부분을 염기서열 분석하여 database 상에 보고된 염기서열과 비교한 결과 PDLs17 유전자는 142 amino acid를 함유하는 단백질로 PCR에서 얻은 서열과 database의 서열이 동일한 것으로 확인되었다 (Fig 3).

다. 면역조직화학적 염색을 이용한 PDLs17 단백질의 조직내 분포 확인

- 1) 치아와 치주조직에 대한 면역 조직화학적 염색에서 PDLs17 단백질은 치주인대에서는 강한 발현이 관찰되며 골 형성 초기의 골모세포양 세포에서도 그 발현이 나타난 반면에 치은에서는 발현이 관찰되지 않았다 (Fig 4, 5).
- 2) 치아와 골, 골수에 대한 면역 조직화학적 염색에서 PDLs17 단백질은 상아모세포 범랑모세포 등에서 약한 발현이 관찰되었고 골수의 간질세포에서도 발현이 나타났으나 골수내의 혈구세포 등에서는 그 발현이 관찰되지 않았다 (Fig 6, 7).
- 3) 골과 정중 구개골 봉합에 대한 면역 조직화학적 염색에서 PDLs17 단백질은 미분화간엽세포를



Figure 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNAs coding for a novel PDLs17. Nucleotides are numbered on the right, cDNA fragment from the subtraction is indicated by shaded areas. Two amino acid peptides which used for the antibody production are underlined.

포함하는 초기 골모세포에서 발현이 관찰되었으나 성숙한 골세포와 골 내부에서는 그 발현이 확인되지 않았다 (Fig 8, 9).

IV. 총괄 및 고찰

치주 질환의 치료는 손상된 치주인대와 치조골을 재생 또는 복원하여 건강한 치아와 치주조직이 유지 되도록 하는 것이다^{29, 30}. 이를 위해서는 먼저 치아를 지지하며 백악질과 치조골을 형성하^{au} 또한 다양한 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가진 치주인대 섬유모세포의 발생과 분화와 관련한 분자생물학적 기전에 관한 연구가 필수적 요소라고 할 수 있다^{31, 32, 33, 34, 35}.

치주인대의 세포들의 분화에 관하여는 치주인대를 구성하는 다양한 세포들이 동일한 모세포에서 유래한 것인지, 아니면 각각 서로 다른 모세포에서 유래하는 것인지 조차 명확히 밝혀져 있지 않기 때문에, 치주질환의 치료에 수반되는 치주조직의 치유와 재생과정에 관여하는 세포들의 정확한 활동양상을 이해하는 데도 많은 어려움을 수반하고 있다. 현재까지의 치주인대의 발생과 분화에 관한 연구들을 요약하면, 1980년대에는 치주인대세포들의 형태학적 및 기능적 특성을 규명하는 연구들이 주로 이루어졌으며, 1990년대에는 치주인대세포의 epidermal growth factor (EGF) binding site, 치주인대세포의 제XII형 교원질과 S100 칼슘결합단백계 (S100 calcium-binding protein family)의 발현 및 최근에는 치주인대세포의 osteoclast specific factor-2 (OSF-2, periostin)의 특이적 발현에 관한 보고들로 대별할 수 있다^{5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43}. 그러나 이러한 연구 결과들은 치주인대에 존재하는 다양한 세포들의 기능적 특성에 관한 이해과정이라 생각할 수 있으며 최근에 발견된 “칼슘결합단백”이나 “periostin” 등도 치주인대의 발생과 분화를 전체적으로 담당하고 조절하는 치주인대 섬유모세포와는 그 관련성이 확인되지 않아서 이들을 통한 치주조직의 발생 전반에 대한 이해와 치주조직 재생에의 응용 등은 어려운 상황이다.

최근에 Park 등²⁸이 배양 치은섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포에서 선택적으로 발현되어

치주인대 섬유모세포의 재생/분화에 관여 할 것으로 기대되는 치주인대섬유모세포-특이 유전자, PDLs5, 17, 22, 25, 31을 검출하였다. 그 중에서도 PDLs17은 새로운 단백질을 만들어내는 유전자로 노던분석, mRNA 인사이투하이브리드 등의 연구에서 다른조직에 비하여 치주인대에서 선택적으로 발현되는 것으로 보고하여 치주인대의 분화와 재생과정에서 그 역할의 가능성을 시사하였다. 그러나 PDLs17이 database 상에서 추정한대로 단백질을 생성하며 이러한 단백질들이 치주조직을 포함한 다양한 조직에서 어떻게 분포하는지 또한 다양한 생체 내의 조절인자들과 어떻게 반응하여 기능을 수행하는지 등에 관하여는 밝혀내지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 첫째로, PCR을 통하여 얻은 PDLs17의 단백질 암호화 영역의 염기서열을 분석하여 이 서열이 database에서 추정된 서열과 일치 한지 확인하여 항체의 형성에 이러한 서열을 이용하고 둘째로, 실제 생체내에서 PDLs17 단백질의 합성과 그 분포를 항체제작과 면역조직화학적 염색을 통하여 밝히고 셋째로, PDLs17의 여러 다양한 성장인자나 cytokine에 대한 반응성을 치주조직에 관여하는 대표적인 인자들인 IL-1 β 를 25 pg/ml 및 50 pg/ml, 재조합 사람 PDGF-BB를 1 ng/ml 및 10 ng/ml, 사람 재조합 TGF- β 를 1 ng/ml 및 20 ng/ml의 농도로 48시간 투여 혹은 2주간 지속적으로 투여하여 PDLs17의 IL-1 β , PDGF 및 TGF- β 투여시간과 농도에 따른 반응양상을 연구하고자 하였다.

RT-PCR을 통하여 얻은 PDLs17의 ORF부분을 염기서열 분석하여 database상에 보고된 염기서열과 비교한 결과 PDLs17 유전자는 142 아미노산을 함유하는 단백질로 PCR에서 얻은 서열과 database의 서열이 동일한 것으로 확인되었는데, 이는 앞으로 치주인대의 분화 또는 재생과정에서 PDLs17 단백질의 역할을 연구하는데 있어 재조합단백질의 합성뿐 아니라 PDLs17단백질 암호화 영역을 세포 내에 주입하여 이에 따른 세포의 변화 양상을 연구하는데 중요한 자료로 활용될 것이다.

PDLs17의 ORF부분을 염기서열 분석을 토대로 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 주문 합성하고 이를 이용

하여 항체를 제작 한 결과 PDLs17 단백질은 생체내에서 실제로 합성되어 주로 성숙한 쥐의 골수의 간질 세포(stromal cells)와 분화 초기의 골모세포양 세포 및 치주인대세포에서 발현된다는 것을 면역조직화학 분석을 통해 관찰하였다. 이 결과는 골수에 존재하는 간질세포도 치주인대세포와 유사하게 다양한 세포로 분화할 수 있는 미분화 간엽 세포(mesenchymal cells)를 포함하고 있다는 점에서 PDLs17 단백질의 발현이 모두 확인된 것은 주목 할 만하나, PDLs17 단백질이 초기의 골모세포양 세포에서 그 발현이 확인된 점과 골수에 존재하는 간엽세포는 중배엽성 기원이며 치주인대에는 그 기원이 다른 외배엽성 기원의 미분화세포가 존재한다는 사실을 고려하면 이에 관하여는 보다 더 깊은 연구가 시행되어야 할 것이다. 성숙 골세포(mature osteocyte)에서는 PDLs17의 발현은 거의 관찰되지 않았는데, 이는 PDLs17이 골수의 간엽세포나 초기 분화중인 골모세포양세포 및 치주인대세포 등의 분화과정에서 특히 초기 과정에 관여한다는 것을 강력하게 시사하는 결과라고 할 수 있다.

한편, Gemmel 등⁴⁴⁾의 연구에 의하면 interleukin 1 β 은 성장인자로 TGF- β 와 더불어 면역성, 염증, 조직 파괴 및 조직항상성 등을 포함하는 치주조직내에서 일어나는 많은 생리적 혹은 병적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 IL-1 β 가 치주인대의 증식 등에 관여하나 배양 치주인대세포에서 투여하면 다양한 기질 단백질들의 합성을 유도하여 석회화 결절의 합성을 억제하는 것으로도 알려지고 있다. PDGF-BB는 Worapamom 등⁴⁵⁾의 보고에 의하면 미분화 간엽세포의 분화와 기능에 중요한 역할을 하며 치주인대의 증식과 이주에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, PDGF-BB가 치은섬유모세포와 치주인대세포의 분열과 주화성을 증가시키는데 중요한 역할을 하는데, 즉 분열하지 않고 있는 치주인대세포에 PDGF를 투여하면 치주인대세포의 분열을 야기시킬 수 있다는 연구 결과도 보고되고 있다⁴⁶⁾. Mumford, TGF- β 는 항상 치유과정에서 중요한 역할을 하고 integrin 발현의 조절인자로 보고되었으며 치주인대의 재생과 치주조직 치유 과정에도 중요

한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{4, 47)}. 그러나 TGF β 의 치주인대의 재생과 치주조직 치유 과정에서의 역할이 치주인대의 증식이나 세포의 분화 등 정확히 어떤 과정에 관여함으로 인하여 나타난 결과인지에 관하여는 아직도 논란이 많다⁴⁸⁾.

본 연구의 RT-PCR 분석을 통하여 여러 인자 투여에 따른 PDLs17의 반응성을 조사한 실험에서, 성장인자 등을 48시간 처리한 경우에는 PDGF-BB와 TGF- β 가 각각 10 ng/ml 및 20 ng/ml의 농도에서 PDLs17의 발현을 증가시켰으나, 2주간 처리하였을 때는 TGF- β 가 20 ng/ml의 농도에서 PDLs17의 발현을 증가시킨 결과로 나타났다. 이 결과로 IL-1 β 는 치주인대 섬유모세포에서 PDLs17 단백질의 합성과 발현과정에 큰 역할을 하지 못함을 알 수 있었으며, PDGF-BB와 TGF- β 가 각각 10 ng/ml 및 20 ng/ml의 농도에서 PDLs17의 발현을 증가시킨 것은 PDGF와 TGF- β 의 적정 사용 농도가 각각 10 ng/ml 및 20 ng/ml라고 보고한 Brady 등⁴⁹⁾과 Mumford 등⁴⁶⁾의 연구결과와 일치한다고 할 수 있다. PDGF-BB의 경우 48시간 처리한 군에서는 PDLs17의 발현이 증가하였으나 2주간 처리한 군에서는 다른 군과 차이가 없는 결과를 나타냈는데 이는 PDGF-BB가 치주인대세포의 분열과 주화성을 증가시키는데 중요한 역할을 하기 때문에, 세포분열능과 주화성이 높은 세포의 초기 배양과정에 PDGF가 작용하여 PDLs17의 발현을 증가시켰으나 전체적으로 세포들이 증식하고 성숙한 단계인 2주 후에는 그 발현의 차이가 없는 즉 PDGF-BB가 PDLs17을 직접적으로 조절하기 세포분열과 증식 등을 통하여 간접적으로 작용함을 시사한다고 할 수 있으나 이에 관하여도 향후 보완 연구가 필요할 것이다. 이에 비하여 TGF- β 는 PDLs17의 발현을 단기간과 장기간의 투여에서 모두 증가시켰는데, 이 결과로 보아 TGF- β 가 PDLs17의 발현을 조절하는 상위 인자로 기능을 할 가능성이 높다고 할 수 있다. 따라서 이는 앞으로의 PDLs17의 프로모터에 관한 연구 등에서 이와 결합하는 조절인자로서 TGF- β 에 관한 실험의 필요성을 제기한 결과라 생각 할 수 있다.

본 연구를 통하여 치주인대 섬유모세포 특이 유전자 PDLs17이 142개의 아미노산을 포함한 새로운 단

백질이며, 치주인대 등의 미분화 단계의 간엽성세포에서 발현되어 치주인대 분화의 초기과정에 관여함을 알 수 있었고, 또한 PDLs17이 TGF- β 에 의하여 조절 될 수 있음을 밝혀냈으나 PDLs17 유전자를 이용한 치주 질환의 치료와 치주조직 재생을 도모하기 위해서는 첫째로, 미분화단계의 치주인대세포에 PDLs17 유전자를 주입하고 Western 분석 등을 통하여 PDLs 단백질의 발현을 조사하는 등의 치주인대분화와 PDLs17의 상관관계를 명확히 규명하여야 하며, 둘째로 PDLs17 단백질에 대한 다클론성 항체를 제작하여 PDLs17 단백질의 정확한 분포와 항체에 의한 억제 작용 등의 연구가 시행되어야 하며, 셋째로, PDLs17 유전자의 프로모타와 전사인자 등에 관한 연구를 통하여 PDLs17 유전자와 다른 다양한 인자들과의 상관성 및 반응성 등에 관하여 조사해야하며, 넷째로, PDLs17 단백질의 구조와 세포내 합성 과정 및 분비 등에 관한 연구와 다섯째로, PDLs17 재조합단백질의 제조 및 응용방법 등에 관한 다양한 연구가 향후 수행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

치주조직이 건강한 사람의 제3대구치의 치근 중간 1/3의 조직에서 배양한 치주인대섬유모세포를 치주인대세포들의 성숙 및 증식에 관여하는 인자들로 알려진 IL-1, PDGF-BB 및 TGF- β 등을 48시간 및 2주간 다양한 농도로 투여 한 후 RT-PCR을 통하여 IL-1, PDGF 및 TGF- β 등의 투여가 배양 치주인대 섬유모세포에서 PDLs17 유전자의 발현에 어떤 영향을 미치는지를 알아보고, 치주인대 섬유모세포-특이 유전자로 알려진 PDLs17 단백질의 분포를 다클론성 항체 제작과 면역조직화학적 염색을 통하여 생쥐의 치주조직을 포함한 다양한 조직에서 그 분포와 발현을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 재조합 사람 IL-1 β , PDGF-BB 및 TGF- β 를 48시간 동안 투여한 후 치주인대 섬유모세포에서 PDLs17 유전자의 발현 양상을 확인한 결과 PDGF를 10ng/ml TGF- β 를 20ng/ml 처리한 군에서 PDLs17의 발현이 증가된 소견이 관찰되었다.

2. 재조합 사람 IL-1 β , PDGF 및 TGF- β 를 2주간 투여한 후 치주인대 섬유모세포에서 PDLs17 유전자의 발현 양상을 확인한 결과 TGF- β 를 20 ng/ml의 농도로 지속 투여한 군에서 PDLs17의 발현이 증가된 양상으로 나타났다.
3. 염기서열 분석에서 PDLs17 유전자는 142 amino acid를 함유하는 단백질로 PCR에서 얻은 서열과 database의 서열이 동일한 것으로 확인되었다.
4. 면역조직화학적 염색에서 PDLs17 단백질은 치주인대에서는 강한 발현이 관찰되며 골 형성 초기의 골모세포양세포와 골수의 간질세포에서도 그 발현이 나타난 반면에 치은, 성숙한 골세포 및 혈구세포 등에서는 발현이 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 치은섬유모세포에 대하여 치주인대 섬유모세포-특이 유전자인 PDLs17은 골수의 간엽세포나 치주인대 세포 등의 세포가 다양한 세포로 분화해 가는 분화의 초기단계에서 그 분화의 조절에 관여하며, 또한 장단기적으로 PDGFBB 및 TGF- β 등의 성장인자에 의하여 그 발현이 조절될 수 있음을 시사하나, 그 정확한 작용 기전에 관하여는 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Cho MI, Garant PR "Development and general structure of the periodontium," *Periodontol* 24:9-27, 2000.
2. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM "Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissue," *J Periodont Res* 32 : 159-165, 1997.
3. Rajshankar D, McCulloch CAG, Tenenbaum HC, Lekic PC "Osteogenic inhibition by rat periodontal ligament cells: modulation of bone morphogenic protein-7 activity in vivo," *Cell Tissue Res* 249:475-483, 1998.
4. San Miguel SM, Goseki-Sone M, Sugiyama E, Watanabe H, Yanagishita M, Ishikawa I "The

- effects of retinoic acid on alkaline phosphatase activity and tissue-non-specific alkaline phosphatase gene expression in human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts." *J Periodont Res* 33:428-433, 1998.
5. Duarte WR, Iimura T, Takenaga K, Ohya K, Ishikawa I, Kasugai S "Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament." *Biochem Biophys Res Commun*, 255:416-420, 1999.
 6. Duarte WR, Kasugai S, Iimura T, Oida S, Takenaga K, Ohya K, Ishikawa I "cDNA cloning of S100 calcium-binding proteins from bovine periodontal ligament and their expression in oral tissues." *J Dent Res* 77(9):1694-1699, 1998.
 7. Johnson PW, Lancero BS "Function of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in the presence of methyl mercaptan." *Quintessence Int* 30(5):343-349, 1999.
 8. Dahan M, Nawrocki B, Elkaim R, Soell M, Bolcato-Bellemin AL, Birembaut P, Tenenbaum H "Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva." *J Clin Periodontol* 28(2):128-136, 2001.
 9. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP "Short analytical review evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis." *Clin Immunol Immunopathol* 72(3):283-292, 1994.
 10. Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I "Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells." *J Dent Res* 77(4):555-564, 1998.
 11. Lekic K, McCulloch CAG "Periodontal ligament cell populations: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue." *Anatomical Record* 245:327-341, 1996.
 12. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG "Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1." *J Cell Biol* 130:393-405, 1995.
 13. Abiko Y, Shimizu N, Yamaguchi M, Suzuki H, Tadiguchi H "Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells." *Annals Periodontol* 3(1):350-369, 1998.
 14. Kapila YL, Lancero H, Johnson PW "The response of periodontal ligament cells to fibronectin." *J Periodontol* 69(9):1008-1019, 1998.
 15. Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CAG "Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro." *J Periodont Res* 36:71-79, 2001.
 16. Morishita M, Yamamura T, Shimazu A, Bachchu AH, Iwamoto Y "Estradiol enhances the production of mineralized nodules by human periodontal ligament cells." *J Clin Periodontol* 26:748-751, 1999.
 17. Somerman MJ, Foster RA, Imm GM, Sauk JJ, Archer SY "Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro." *J Periodontol* 60(2):73-77, 1989.
 18. Carnes DL, Maeder CL, Graves DT "Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament." *J Periodontol* 68(7):701-707, 1997.
 19. Chien HH, Lin WL, Cho MI "Interleukin-1 β induced release of matrix proteins into culture media causes inhibition of mineralization of nodules formed by periodontal ligament cells in vivo." *Calcif Tissue Int* 64:402-413, 1999.
 20. Sawa Y, Phillips A, Hollard J, Yoshida S, Braithwaite MW "The in vivo life-span of human periodontal ligament fibroblasts." *Tissue & Cell* 32(2):163-170, 2000.
 21. Wise GE, Zhao L, Grier IV RL "Localization and expression of CSF-1 Receptor in rat dental folli-

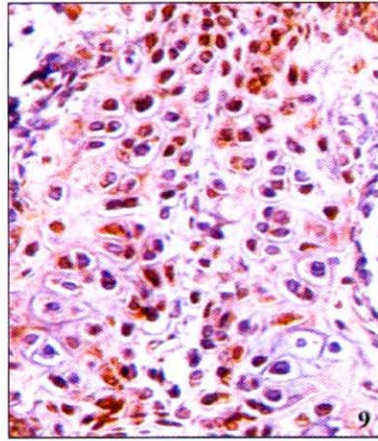
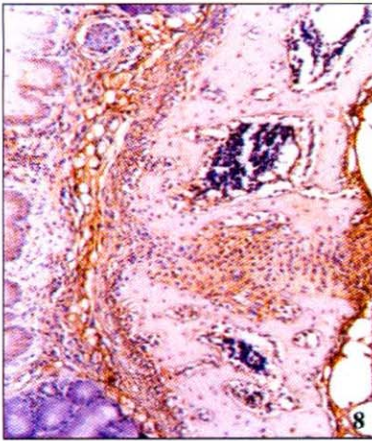
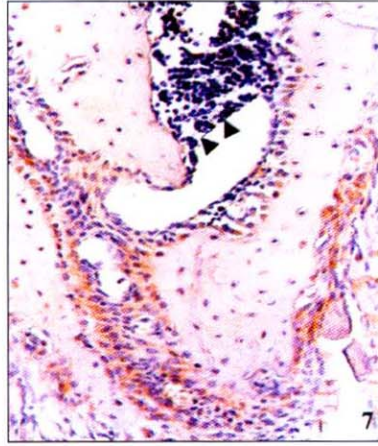
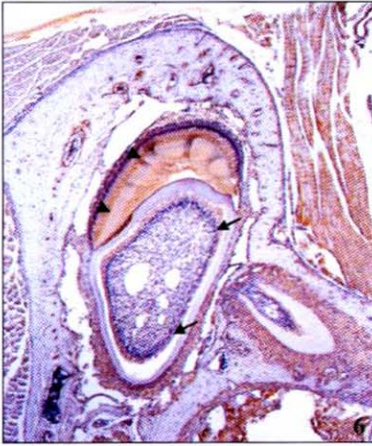
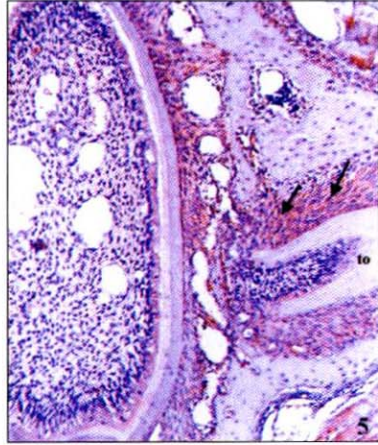
- cle cells." *J Dent Res* 76(6):1244-1249, 1997.
22. Arzate H, Alvarez-Perez MA, Aguilar-Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O "Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro." *J Periodontal Res* 33(5):249-258, 1998.
 23. Cho MI, Matsuda N, Lin WL, Moshier A, Ramakrishnan PR "In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat." *Calcif Tissue Int* 50:459-467, 1992.
 24. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A, "Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor β ". *J. Bone. Mineral. Res.* 14: 1239-1249, 1999.
 25. Giannopoulou C, Cimasoni G "Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts." *J Dent Res* 75(3):895-902, 1996.
 26. Van der Pauw MT, Van Den Bos T, Everts V, Beertsen W "Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor β_1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts." *J Periodontol* 71(1):31-43, 2000.
 27. Wada N, Maeda H, Tanabe K, Tsuda E, Yano K, Nakanuta H, Adamine A "Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function : the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor." *J Periodont Res* 36:56-63, 2001.
 28. Park JC, Kim YB, Kim HJ, Jang HS, Kim HS, Kim BO, Han KY "Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs." *Biochem Biophys Res Commun.* 20:282(5):1145-53, 2001.
 29. Amar S "Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration." *Anatomical Record* 245:361-373, 1996.
 30. Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, Takacs V, Oates TW "Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells." *J Periodontol* 71(2):226-237, 2000.
 31. Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, Fausser JL, Haikel Y, Tenenbaum H "Expression of mRNAs encoding for α and β integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts." *J Dent Res* 79(9):1712-1716, 2000.
 32. Brandsten C, Lundmark C, Christersson C, Hammarstrom L, Wurtz T "Expression of collagen $\alpha 1(I)$ mRNA variants during tooth and bone formation in the rat." *J Dental Res* 78(1):11-19, 1999.
 33. Nishimura F, Naruishi K, Yamada H, Kono T, Takashiba S, Murayama Y "High glucose suppresses cathepsin activity in periodontal ligament derived fibroblastic cells." *J Dent Res* 79(8):1614-1617, 2000.
 34. Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI "Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro." *Calcif Tissue Int* 57:52-59, 1995.
 35. Takiguchi T, Kobayashi M, Nagashima C, Yamaguchi A, Nishihara T, Hasegawa K "Effect of prostaglandin E₂ on recombinant human bone morphogenetic protein-2-stimulated osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells." *J Periodont Res* 34:431-436, 1999.
 36. Cho MI, Garant PR "Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat." *The Anatomical Record* 245:342-360, 1996.

37. Cho MI, Lin WL, Garant PR "Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat: A light and electron microscopic radioautographic study." *Anatomical Record* 231:14-24, 1991.
38. Matsuda N, Yokoyama K, Takeshita S, Watanabe M "Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells in vitro." *Archives of Oral Biol* 43:98-997, 1998.
39. Nishimura F, Terranova VP "Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors." *J Dent Res* 75(4): 986-992, 1996.
40. Ogiso B, Hughes FJ, Davies JE, McCulloch CA "Fibroblastic regulation of osteoblast function by prostaglandins." *Cell Signal* 4(6):627-639, 1992.
41. Palmon A, Roos H, Reichenberg E, Grosskop A, Bar Kana I, Pitaru S, Redlich M "Basic fibroblast growth factor suppresses tropoelastin gene expression in cultured human periodontal fibroblasts." *J Periodont Res* 36:65-70, 2001.
42. Parkar MH, Kuru L, Giouzeil M, Olsen I "Expression of growth-factor receptors in normal and regeneration human periodontal cells." *Arch Oral Biology* 46(3):275-284, 2001.
43. Ye J, Nishimura F, Orman R, Terranova VP "Isolation, purification, and partial characterization of an autocrine periodontal ligament cell chemotactic factor." *J Dent Res* 74(6):1303-1309, 1995.
44. Gemmel E, Marshall RI, Seymour GJ "Cytokine and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease." *Periodontol* 14:112-143, 2000.
45. Worapamom W, Li H, Haase HR, Pujic Z, Girfes AA, Bartold PM "Cell surface proteoglycan expression by human periodontal cells." *Connective Tissue Res* 41(1):57-68, 2000.
46. Mumford JH, Cames DL, Cochran DL, Oates TW "The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model." *J Periodontol* 72:331-340, 2001.
47. Gao J, Symons AL, Bartold PM "Expression of transforming growth factor-beta 1(TGF- β 1) in the developing periodontium of rats." *J Dent Res* 77(9):1708-1716, 1998.
48. Chien HH, Lin WL, Cho MI "Expression of TGF- β isoforms and their receptors during mineralized nodule formation by rat periodontal ligament cells in vitro." *J Periodont Res* 34:301-309, 1999.
49. Brady TA, Piesco NP, Buckley MJ, Langkamp HH, Bowen LL, Agarwal S "Autoregulation of periodontal ligament cell phenotype and functions by transforming growth factor- β 1." *J Dent Res* 77(10):1779-1790, 1998

사진부도 설명

- Figure 4 Tooth and PDL of 30-day-old mouse immunostained for PDLs17 polyclonal antibody ($\times 100$). Positive reactions are clearly noted in the PDL (arrows) and bone marrow (arrowheads) but not in gingival fibroblasts. GF, gingival fibroblast; to, tooth; p, tooth pulp.
- Figure 5 Tooth and periodontium of 30-day-old mouse immunostained for PDLs17 polyclonal antibody ($\times 200$). PDLs17 is expressed in the PDL (arrows), to, tooth.
- Figure 6 Tooth, PDL and alveolar bone of 30-day-old mouse immunostained for PDLs17 polyclonal antibody ($\times 100$). A few odontoblasts (arrows) and ameloblasts show a lower level of PDLs17 expression in the tooth.
- Figure 7 Bone and bone marrow of 30-day-old mouse immunostained for PDLs17 polyclonal antibody ($\times 200$). The PDLs17 are observed in the differentiating osteoblast-like cells but not in the hematopoietic cells (arrowheads).
- Figure 8 Mid-palatal suture of 30-day-old mouse immunostained for PDLs17 polyclonal antibody ($\times 100$). Expression of the PDLs17 protein are observed in the differentiating osteoblast-like cells but not in mature osteocytes.
- Figure 9 Developing mesenchymal cells of mid-palatal suture of 30-day-old mouse immunostained for PDLs17 polyclonal antibody ($\times 400$)

사진부도 (1)



The Effect of Interleukin 1- β , Platelet Derived Growth Factor-BB and Transforming Growth Factor- β on the expression of PDLs17 mRNA in the Cultured Human Periodontal Ligament Fibroblasts.

Ki-Jung Lim, Kyung-Yoon Han, Byung-Ock Kim,
Chang-Yeob Yeom, Joo-Cheol Park*

Dept. of periodontology, Dept. of Oral Histology* College of Dentistry, Chosun University

The molecular mechanisms control the function of PDL(periodontal ligament) cells and/or fibroblasts remain unclear. PDLs17, PDL-specific gene, had previously identified the cDNA for a novel protein from cultured PDL fibroblasts using subtraction hybridization between gingival fibroblasts and PDL fibroblasts. The purpose of this study was to determine the regulation by growth factors and cytokines on PDLs17 gene expression in cultured human periodontal ligament cells and observe the immunohistochemical localization of PDLs17 protein in various tissues of mouse.

Primary PDL fibroblasts isolated by scraping the root of the extracted human mandibular third molars. The cells were incubated with various concentration of human recombinant IL-1 β , PDGF-BB and TGF β for 48h and 2 weeks. At each time point total RNA was extracted and the levels of transcription were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR assay). Polyclonal antiserum raised against PDLs17 peptides, CLSVSYNRSYQINE and SEAVHETDLHDGC, were made, and stained the tooth, periodontium, developing bone, bone marrow and mid-palatal suture of the mouse.

The results were as follows.

1. PDLs17 mRNA levels were increased in response to PDGF (10ng/ml) and TGF β (20ng/ml) after treatment of the IL-1 β , PDGF-BB and TGF β for 48 h.
2. PDLs17 was up-regulated only by TGF β (20 ng/ml) after treatment of the IL-1 β , PDGF-BB and TGF β for 2 weeks and unchanged by the other stimulants.
3. PDLs17 was a novel protein coding the 142 amino acid peptides in the ORF and the nucleotide sequences of the obtained cDNA from RT-PCR was exactly same as the nucleotides of the database.
4. Immunohistochemical analysis showed that PDLs17 is preferentially expressed in the PDL, differentiating osteoblast-like cells and stromal cells of the bone marrow in the adult mouse.
5. The expression of PDLs17 protein was barely detectable in gingival fibroblasts, hematopoietic cells of the bone marrow and mature osteocytes of the alveolar bone.

These results suggest that PDLs17 might upregulated by PDGF-BB or TGF β and acts at the initial stage of differentiation when the undifferentiated mesenchymal cells in the bone marrow and PDL differentiate into multiple cell types. However, more research needs to be performed to gain a better understanding of the exact function of PDLs17 during the differentiation of bone marrow mesenchymal and PDL cells.

Key words : PDL, PDLs17, Immunohistochemistry, IL-1 β , PDGF-BB, TGF- β