Rat periodontal ligament cell에서의 RANKL mRNA의 발현

김현수 · 정현주 · 김영준 · 김옥수

전남대학교 치과대학 치주과학교실 및 치의학연구소

I. 서 론

치주조직은 다양한 경조직과 연조직으로 구성되어 있는데 그 구조로는 치은, 치주인대, 백악질, 그리고 치조골이 있다. 치주인대는 치근을 둘러싸고 있는 백악질과 치조골을 연결시키는 결합조직으로 영양공급과 신경전달에 관여하고 있다[1]. 또한 치조골의 혈관통로를 통하여 골수강과 연결된다. 치조골은 계속적인 골형성과 흡수가 일어나는 역동적 조직이다. 그러므로 골대사에 이상이 생기면 골흡수와 골형성의 불일치가 일어날 수 있다[2,3].

여러 종류의 cytokine이 염증성 질환을 매개한다[3,4]. 치주질환에서 proinflammatory cytokine의 생성은 골흡수를 유도하며 조직의 정상적인 기능에 부정적인 영향을 미치게된다. 특히 치주인대세포나 골아세포등에 의해 조절되는 복잡한 cytokine network는 골흡수와 직접적인 관련이 있다[2,3].

치조골의 파괴는 골흡수의 주세포인 파골세포의 활성에 의해 일어난다[3]. 파골세포는 조혈세포에서 유래하는 거대 다핵세포이다. 최근 골에서 파골세포의 형성과 기능에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[4-7]. 파골세포는 조혈전구세포의 분화에 의하여 발생되고, 조골세포와 골수기질세포에 의해 분비되는 여러 가지 물질에 의하여 조절이 된다. 현재 조골세포 혹은 골수기질세포의 세포표면단백질인 osteoclast differentiation factor (ODF)가 파골전구세포의 수용체를 통하여 osteoclastogenesis를 촉진시킨다. ODF는 파골전구세포의 파골세포로의 분화에 중요한 신호를 보내는데, TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)/Receptor activation of nuclear factor κB ligand (RANKL)과 동일하고 T-cell growth와 dendritic cell의 기능을 증가시킨다. Osteoprotegerin (OPG)는 조골세포가 분비하는 표면단백질로서 RANKL과 전파골세포간의 결합을 차단시킴으로써 osteoclastogenesis를 억제한다[4-6,8].

치주질환은 치조골 감소를 특징으로 하는 염증성 질환으로 치조골 감소는 골생성보다 골흡수가 더 커서 나타나게 되는데, 이 과정에 치주인대세포가 관여할 것으로 생각된다[9]. 골아세포와 골수간세포(stromal cell)에 cytokine 및 vitamin D등의 자극을 주면 RANKL과 OPG가 분비되는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 세포이외에 치아관련 세포들 즉, 치주인대 세포, 조상아세포 및 치수세포에서도 그 발현이 보고되었다. Rani 등[10]은 조상아세포와 치수세포에서 RANKL과 OPG의 발현을 처음으로 보고하였고, Kanzaki 등[11]도 치주인대세포에 1α,25-dihydroxyvit-

교신저자: 정현주, 광주광역시 동구 학동 5번지, 전남대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-757

amin D_3 첨가시 RANKL과 OPG가 발현됨을 보고하는 등 치주인대세포가 교정적인 치아이동 및 치주질환에 의한 골흡수와 관련되어 중요한 세포임을 시사하였다.

따라서 치주인대세포가 치조골에서의 파골세포 분화에 중요한 역할을 할 것으로 예상되며, 이 세포에 의한 RANKL과 OPG의 발현을 조절할 수 있다면 치조골의 파괴를 억제시킬 수 있는 한 방법이 될 수 있다. 그러나 현재까지 치주인대세포에 RANKL과 OPG 발현을 관찰한 연구 보고는 드물며, 특히 cytokine에 자극된 치주인대세포에서 RANKL과 OPG 발현을 보고한 연구는 아직 없다. 이에 이번 연구의 목적은 치주인대세포에 의한 osteoclastogenesis 조절의 첫 단계로서 여러 농도의 IL-1β로 치주인대세포를 자극하고, 이 세포에 의한 RANKL과 OPG의 발현 양상을 관찰함으로써 파골세포 유도에 대한 치주인대 세포의 역할을 알아보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 백서 치주인대세포의 배양

백서의 치주인대세포의 분리는 Matsuda 등[13]의 방법에 준하여 시행하였다. 치아 발거전 5일동안 0.4% β-aminopropionitrile (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 수용액을 수분으로 섭취시켰다. 실험동물에 pentobarbital sodium 30 mg/kg을 복강내 주사하여 마취시킨 후 상악 좌, 우측 제 1 대구치를 발거하였다. 발거 1-2일 후 발치와내의 혈병을 제거하여 세절한 다음 35 mm 배양접시에 고르게 분산시켜 1% antibiotic-antimycotic solution (Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 실험에는 계대배양 5-7세대의 것을 사용하였다.

2. RANKL Immunoassay

백서 치주인대세포를 12 well plate에 1 x 10^5 개의 세포가 되게 분주하고 90% 정도의 밀생에 도달하는 36~48시간 후 배지를 0.3% fetal bovine serum이 함유된 배지로 교환하고 8시간 동안 배양하였다. IL-1β 농도 0.01~10 ng/ml을 첨가한 후 16-18시간 배양하였다. 치주인대세포로부터 유리되는 soluble RANKL의 양은 세포 배양 상층액을 회수하여 enzyme immunoassay kit (Quantikine®, R&D, U.S.A)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라서 처리하고 ELISA plate reader (Microplate manager® BioRad, U.S.A)로 파장 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 양을 분석하였다.

3. 백서 치주인대 세포의 RANKL과 OPG 유전자 발현

1) IL-1β처치

백서 치주인대 세포를 100 mm dish (Falcon, U.S.A.)에 분주한 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 밀생에 도달하면 0.3% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 후 약 8 시간 후 IL-1β 0.01~10 ng/ml를 첨가하고 16~18시간 배양하였다.

2) 총 RNA 추출

RNA의 분리는 배양액을 제거하고 2.0 ml의 Trizol (Promega, U.S.A.)을 첨가하여 각각의 Triclosan 농도에서 분리된 세포를 1.8ml tube에 수집하였다. 200μl의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4℃, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액만을 취한 후 500 μl isoprophyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4℃, 10,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA는 T/E buffer 40μl에 녹인 후 spectrophotometer (BioRad, U.S.A.)로 그 양을 측정하였으며 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

3) 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

추출된 총 RNA중 5ug을 RT reaction을 위하여

PCR primers

Primer	*Expected base pairs*	*Sequence (5'-3')*
GAPDH-sense (+)	418	CACCATGGAGAAGGCCGGGG
GAPDH-antisense (-)		GACGGACACATTGGGGGTAG
OPG-sense (+)	492	TGTAGAGAGGATAAAACGG
OPG-antisense (-)		CTAGTTATAAGCAGCTTAT
RANKL-sense (+)	499	CAGCACTCACTGCTTTTATAGAATCC
RANKL-antisense (-)		AGCTGAAGATAGTCTGTAGGTACGCC

PCR programs

GAPDH	94 ℃ 1 min	94 ℃ 1 min	60 ℃ 2 min	72 ℃ 1 min	72 ℃ 10 min
		25 Cycles			
OPG RANKL	94 ℃ 1 min	94 ℃ 1 min	50 ℃ 2 min	72 ℃ 1 min	72 ℃ 10 min
		30 Cycles			

Figure 1. Amplification primer sets and conditions used in polymerase chain reaction. GAPDH indicates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; OPG, osteoprotegerin; and RANKL, receptor activation of nuclear factor κB ligand.

사용하였다. Superscript II(GibcoBRL, U.S.A.)를 이용하여 70℃ 10분, 42℃ 70분, 37℃ 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. PCR반응은 10x PCR 완충용액 (GibcoBRL, U.S.A.) 5㎕, 1.5 mM MgCl2 3㎕, 10 mM dNTP mix 1㎕, 각각의 primer 2.5㎕, 5 unit Taq polymerase 0.2㎕, 합성된 cDNA 2㎕를 혼합한 후 3차 증류수를 이용하여 총 50㎕가 되게 하였다. PCR 반응 혼합물들을 PCR cycler (Thermocycler, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물들은 loading buffer 2㎕를 첨가하여 총 10㎕가 되게 하여 1.5% agarose gel에서 running 하였다. 얻어진 PCR data는 gel image analysis system (QualityOne®, BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 하여 각각의 상대적인 발현 비율을 산출하고 그 결과를 분석하였다.

4. 통계학적 분석

실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA를 시행하고 사후검정은 Duncan 법을 통하여 검증하였다.

III. 결 과

1. IL-1β자극에 의해 유도된 soluble RANKL의 측정

Soluble RANKL의 양은 대조군은 709 pg/ml 이었으며 IL-1β 0.01 ng/ml은 776 pg/ml, IL-1β 0.1 ng/ml은 808 pg/ml, IL-1β 1.0 ng/ml은 833 pg/ml, IL-1β 5.0 pg/ml은 856 pg/ml IL-1β 10.0 ng/ml 군은 859 pg/ml로 IL-1β의 농도가 증가할수록 그 양이 증가하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Figure 2).

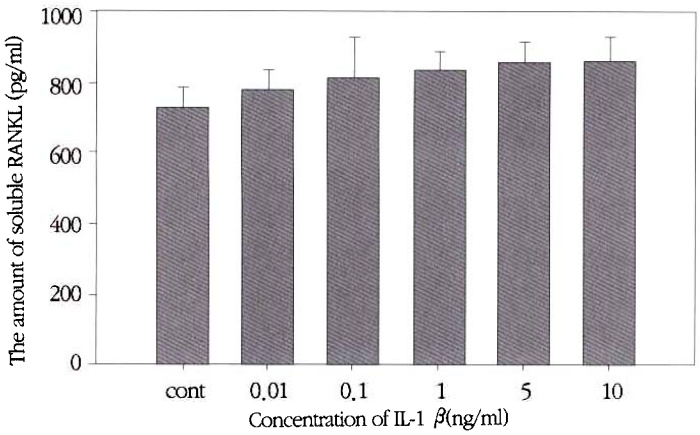

Figure 2. The amount of RANKL production in IL-1 βstimulated fetal rat calvarial cells

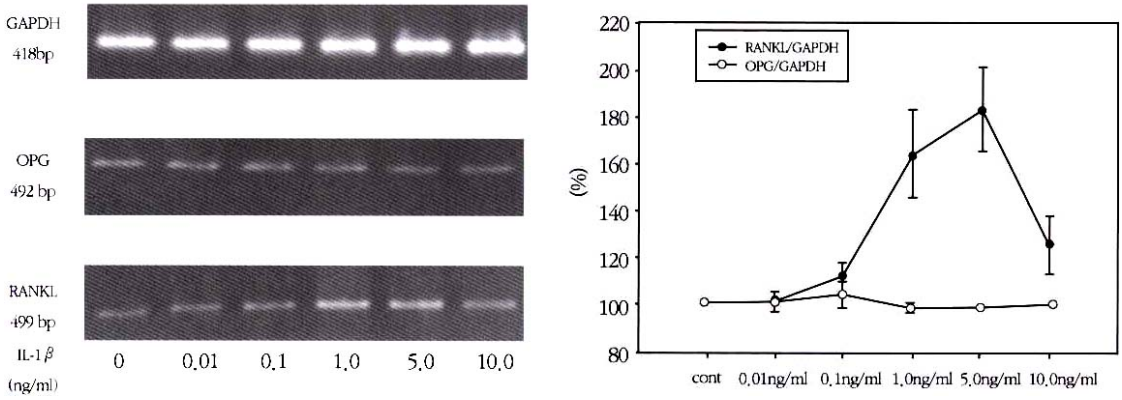

Figure 3. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of receptor activation of nuclearfactor κB ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) and glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogense (GAPDH) messenger RNA expression in rat periodontal ligament cells.

2. IL-β자극 후 백서 치주인대 세포의 RANKL과 OPG 유전자 발현

백서 치주인대 세포의 RANKL 유전자 발현을 측정하였을 때, IL-1β 0.01 ng/ml에서는 대조군과 유사한 density를 보였고 IL-1β 0.1 ng/ml에서는 발현 density가 대조군에 비하여 12%, IL-1β 1.0 ng/ml에서는 64%, IL-1β 5.0 ng/ml에서는 대조군에 비해 84%의 density 증가를 보였다. 그러나 IL-1β 10.0 ng/ml에서는 26%의 density 증가를 보였다. 이 결과는 백서 치주인대 세포에서 RANKL 유전자의 발현은 IL-1β 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으나 고농도에서는 RANKL 유전자 발현이 감소하는 경향을 보였다. 그러나 OPG 유전자 발현은 IL-1β농도에 관계없이 일정하게 발현되었다 (Figure 3).

IV. 고 찰

골은 끊임없이 변화하는 조직으로서 조골세포와 파골세포에 의한 형성과 흡수가 균형을 이루면서 그 형태와 기능을 유지하게 된다[9]. 하지만 그 균형이 깨지면 골다공증 및 osteopetrosis와 같은 골대사성 질

환이 발생하게 된다[13]. 치주질환 역시 치조골의 파괴를 특징으로 하는 염증성질환으로 골형성과 흡수의 균형이 깨짐으로서 나타난다. 건강한 치주조직에 있어 치주인대세포는 치조골을 보호할 수 있지만, 치주질환이 존재하는 경우에는 proinfalmmatory cytokine인 IL-1β와 TNFα등에 의하여 자극을 받은 치주인대세포가 osteoclastogenesis를 유발시키는 물질들을 분비함으로서 치주조직의 파괴를 가져올 수 있다[14, 15].

조골세포에 의한 RANKL과 OPG의 발현은 골흡수와 골형성의 조절에 있어서 매우 중요하다. 또한 최근의 연구에 의하면 치아관련 세포들인 조상아세포, 치수세포 및 치주인대세포에서도 RANKL과 OPG의 발현이 보고되었다. 치주인대세포는 치주염이 존재시 골흡수에 관여할 뿐만 아니라 교정 치료시 골 형성과 골흡수에 관여하는 등 치조골의 골개조에 중요한 역할을 담당하는 세포로 알려져 있다. 따라서 치주인대세포에 의한 osteoclastogenesis의 조절은 치주질환에 의한 골흡수 뿐만 아니라 치아이동시 골개조에도 중요하다. 그러나 치주인대세포에 의한 RANKL과 OPG를 관찰한 연구는 드물다. 이에 이번 연구에서는 치주인대세포에 의한 파골세포 유도의 역할을 규명하는 첫 단계로 proinflammatory cytokine인 IL-1β로 치주인대세포를 자극 후 이 세포에 의한 RANKL과 OPG의 발현 양상을 immunoassay와 RT-PCR을 통해 관찰하였다.

OPG는 tumor necrosis factor의 일원으로서 현재까지 생체내에서 발현되는 TNF receptor family중 유일하게 수용성 형태로만 존재하는 것으로 알려져 있으며 파골세포 생성을 억제하는 기능을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다. 곧 이어 발견된 osteoclast differentiation factor (ODF)는 OPGL, TRANCE 혹은 RANKL이라고 불리운다. 이 RANKL은 TNF receptor family의 다른 일원으로 세포막 수용기 RANK (receptor activator of NF-kB)와 작용하여 파골세포의 분화와 활성을 유도한다. RANK는 파골세포 전구세포에서 ODF에 대한 유일한 signaling receptor로 알려져 있다. 반면 OPG는 RANKL의 수용성 decoy receptor로 밝혀졌다[5-8].

최근까지 골흡수 기전에 대한 여러 연구결과들을 볼 때 osteotropic factors인 1α,25-dihydroxyvitamin D_3, parathyroid hormon (PTH), IL-11등이 조골세포/기질세포에 작용하여 RANKL과 M-CSF를 생성하게 되고 CFU-M cell은 M-CSF의 자극을 받아서 파골세포 전구세포로 되며, 이 파골세포 전구세포는 조골세포/기질세포와 접촉하여 세포간 상호작용을 통하여 파골세포로 분화된다. 이 과정에서 RANK와 RANKL은 파골세포의 생성 및 이에 따른 골흡수를 유도하며, 반면 OPG는 파골세포의 생성 및 골흡수를 억제하는 것으로 보고되고 있다.

최근 치주인대세포가 조골세포에 의한 골형성에 중요한 역할을 하는 alkaline phosphatase[16]와 파골세포의 분화 조절에 관여하는 RANKL과 OPG가 발현된다고 보고되었다. 따라서 치주인대세포는 치조골 대사에 중요한 역할을 할 것으로 예상되며 이에 본 실험에서는 세균 및 세균 자극에 의해 치주조직 세포들에서 생성되는 proinflammatory cytokine인 IL-1β를 치주인대세포에 자극시 RANKL과 OPG 발현을 관찰하고자 하였다.

Soluble RANKL은 조골세포나 골수 유래의 골수간세포(stromal cell)에 parathyroid hormone이나 적절한 cytokine의 자극시 분비된다고 알려져 있으며[5, 6], 그 관찰방법은 주로 분자 생물학적 기법을 이용하고 있다. Soluble RANKL의 합성이나 발현을 관찰하는 방법은 immunoassay(ELISA)와 western blot analysis가 있다[5]. Western blot을 이용하여 관찰할 때에는 세포의 상청액(supernatant)을 회수하여 동결 건조시켜 분말로 만든 후, 그것을 다시 적절한 세포 용해제로 녹여서 용액으로 만든 후 SDS-PAGE gel에 전기영동하여 관찰하는 방법이다. Immunoassay를 이용하는 방법은 세포의 상층액을 회수하여 그 중 일부를 해당 항체가 들어있는 ELISA plate에 넣고 일정시간 반응 후 기계상에서 흡광도의 차이를 이용하여 그 양을 측정하는 방법으로 western blot보다 더 간단하고 정량분석이 가능하다. 이에 본 연구에서도 soluble RANKL의 관찰을 위하여 보편적으로 이용되는 immunoassay 방법을 선택하였다.

Soluble RANKL의 발현을 immunoassay를 통하여

관찰한 결과 soluble RANKL의 양은 대조군은 709 pg/ml 이었으며 IL-1β 0.01 ng/ml은 776 pg/ml, IL-1β 0.1 ng/ml은 808 pg/ml, IL-1β 1.0 ng/ml은 833 pg/ml, IL-1β 5.0 pg/ml은 856 pg/ml IL-1β 10.0 ng/ml 군은 859 pg/ml로 IL-1β의 농도가 증가할수록 그 양이 증가하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 soluble RANKL의 합성양이 기대했던 것보다 적고 그 편차가 심했다. 이와 같은 결과에 대한 가능성을 추정해 보면 배양시간의 문제와 추출한 상층액의 적절한 처리를 들 수 있다. 본 실험은 IL-1β로 자극하고 16-18시간동안 배양 후 관찰한 결과로 세포내에서 RANKL이 합성되어 분비되기까지 충분한 시간이었는가의 고려가 필요하다. 또한 본 실험에 이용된 세포의 상층액은 수집 후 측정시까지 -70 ℃ 초저온 냉동고에 보관하였다가 농축 등의 적절한 처리없이 바로 RANKL ELISA plate에서 분석하였다. 따라서 향 후 cytokine 자극 후 더 오랜 시간 배양하거나 회수된 상층액을 농축시키는 방법 등의 적용을 통하여 ELISA 방법에 의한 관찰시 기술적인 면의 개선이 필요하리라 생각된다.

골아세포와 stromal cell에 의한 osteoclastogenesis의 조절은 RANKL과 OPG에 의한다고 알려져 있다. 최근에는 조상아세포와 치주인대세포에서도 RANKL의 발현이 보고되었다. 건강한 치주조직의 치주인대세포들은 치조골을 보호할 수 있지만 치주질환시 세균 및 염증 관련세포들이 분비하는 proinflammatory cytokine에 의해 자극 받은 치주인대세포들이 osteoclastogenesis를 유도할 가능성이 있다. 따라서 이번 연구에서는 proinflammatory cytokines의 하나인 IL-1β에 의해 자극된 치주인대세포가 파골세포의 분화 조절에 중요한 물질인 RANKL과 OPG의 발현을 어떻게 조절하는지를 RT-PCR로 관찰하였다.

백서 치주인대세포에 IL-1β 0.01 ng/ml에서 IL-1β 5.0 ng/ml으로 자극시, RANKL 유전자 발현은 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현 density가 증가하였다. 그러나 IL-1β 10.0 ng/ml에서는 대조군보다 발현 density는 더 높았으나 IL-1β 1.0 ng/ml와 5.0 ng/ml에서 보다 발현이 낮아 치주인대세포에 의한 IL-1β자극에 의한 RANKL 발현은 bi-phasic aspect를 보였다. 그러나 OPG 유전자 발현은 IL-1β농도에 관계없이 일정하게 발현되었다. 골아세포와 bone stromal cell에 의한 RANKL과 OPG의 발현은 여러 가지 cytokine와 호르몬에 따라서 다양하게 조절된다. Proinflammatory cytokine인 IL-1과 TNF-α는 RANKL 발현을 증가시킨다[17]. Parathyroid hormone과 glucocorticoids는 RANKL의 발현을 증가시키고 또한 OPG의 발현을 감소시키고[18, 19], 1α,25-dihydroxyvitamin D_3는 RANKL의 합성을 증진시켜서 골흡수를 증진시킨다[20]. 그러나 TGF-β와 estrogen은 OPG 합성을 증진시켜서 osteoclastogenesis를 조절한다[21, 22]. 이번 연구에서도 IL-1β는 치주인대세포의 RANKL의 발현을 조절하여 osteoclastogenesis를 유도함을 알 수가 있었다.

본 실험결과 치주인대세포는 RANKL과 OPG 유전자를 모두 발현하였으며, 치주인대세포가 치조골 흡수에 중요한 파골세포의 분화 조절에 중요한 역할을 할 것으로 사료되었다. 그러나 본 실험은 치주인대세포에 의한 osteoclastogenesis 조절의 기초적인 연구이다. 향 후 치주인대세포에서 RANKL 및 OPG 발현의 신호전달 경로에 대한 더 많은 연구를 통하여 치조골 흡수를 예방하거나 억제시킬 수 있는 약제의 개발이 가능하리라 생각된다.

V. 결론

염증성 질환인 치주질환에서 나타나는 치조골 소실은 골생성보다 골흡수가 더 커서 나타나게 되는데 이 과정에 치주인대세포가 관여할 것으로 보인다. 현재 치주인대 세포에서의 receptor activation of nuclear factor κ B ligand (RANKL)과 osteoprotegerin (OPG)의 발현이 보고되고 있고 따라서 치주인대 세포가 치조골에서의 파골세포 분화에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

이에 본 연구는 proinflammatory cytokine인 IL-1β 자극시 치주인대 세포에서 osteoclastogenesis에 중요한 RANKL과 OPG의 발현을 알아보고 파골세포 유도에 대한 치주인대 세포의 역할을 규명하고자 하였다. 백서에서 채취, 분리한 치주인대세포에 IL-1β

로 자극을 준 후 immunoassay를 시행하였으며 RANKL과 OPG의 유전자 발현을 RT-PCR로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Soluble RANKL의 immunoassay 결과, 대조군은 709 pg/ml 이었으며 IL-1β 0.01 ng/m~10.0 ng/ml 자극시 776 pg/ml~859 pg/ml로 나타나 IL-1β의 농도가 증가할수록 그 양이 증가하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다
2. 백서 치주인대 세포의 RANKL 유전자 발현은 IL-1β 0.01 ng/ml에서는 대조군과 유사하였고 IL-1β 0.1 ng/ml~5.0 ng/ml 자극시 대조군에 비하여 12%~84%증가하였으나 IL-1β 10.0 ng/ml 자극시 26% 증가하였다.
3. OPG 유전자 발현은 IL-1β농도에 관계없이 일정하였다.

이상의 결과는 백서 치주인대 세포에 IL-1β자극시 RANKL 유전자 발현을 통하여 osteoclastogenesis를 조절할 수 있음을 시사한다.

VI. 참고문헌

1. Melcher AH: Cellular activity in adaptation of the periodontium. In:Malocclusion and the periodontium, JA McNamara, Jr, and KA Ribbens, Eds., Craniofacial Growth Series Monograph No 15 Ann Arbor, Michigan: University of Michigan Press, 1-15:1984.
2. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA: Cellular origins and differentiation control mechanical during periodontal development and wound healing. J Periodont Res 29:81-94, 1994.
3. Mundy GR: Role of cytokines in bone resorption. J Cell Biochem 53:296-300, 1993.
4. Kumar S, Votta BJ, Riemann DJ, Badger AM, Gowen M, Lee JC: IL-1 and NF-induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. J Cell Physiol 187:294-303, 2001.
5. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H: Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappa B ligand; modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem Biophys Res Comm 275:768-775, 2000.
6. Hofbauer LC, Heufelder AE: Role of receptor activator of nuclear factor-kB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med 79:243-253, 2001.
7. Siggelkow H, Eidner T, Lehmann G, Viereck V, Raddatz D, Munzel U, Hein G, Hufner M: Cytokines, osteoprotegerin, and RANKL in vitro and histomorphometric indices of bone turnover in patients with different bone diseases. J Bone Miner Res 18:529-38, 2003
8. Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, Inoue J: Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. EMBO J. 20:1271-1280, 2001.
9. Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW: Contemporary periodontics. CV Mosdy, St Louis, 47-54,1990.
10. Rani CS, MacDougall M: Dental cells express factors that regulate bone resorption. Mol Cell Biol Res Comm 3:145-52, 2000.
11. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H: Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. J Dent Res 80:887-91, 2001.
12. Matsuda N, Kumar M, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI; Evidence for up-regulation of epidermal growth factors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabiliza-

tion of phenotype in vitro. Arch Oral Biol. 38:559-569, 1993.

13. Prestwood KM, Kenny AM, Kleppinger A, Kulldorff : Ultralow-dose micronized 17beta-estradiol and bone density and bone metabolism in older women: a randomized controlled trial. JAMA. 290:1042-8, 2003 .
14. Graves DT, Cochran D: The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol 74:391-401, 2003.
15. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, Gogly B: Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression. J Periodontol 74:196-201, 2003.
16. 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. J Dent Res 77:1779-90, 1998.
17. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Martin T: Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α, but not interleukin-6, stimulate oseoprotegrin ligand gene expression in human osteoblastic cells. Bone 25:255-259, 1999.
17. Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y: Transforming growth factor-β stimulates the production of osteoprogerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. J Biol Chem 273:27091-27096, 1998.
18. Lee SK, Lorenzo JA: Parathyroid hormone stimulate TRANCE and inhibits osteoprotegerin with messenger RNA expression in murine bone marrow cultures; correlation with osteoclast like cell formation. Endocrinology 140:3552-3561, 1999.
19. Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S: Promotor structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. BiochemBiophys Acta 1445:134-141, 1999.
20. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL: Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells. Endocrinology 140:4382-4389, 1999.
21. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL: Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology 140:4367-4370, 1999.

-Abstract-

Expression of mRANKL in rat PDL cell

Hyun-Soo Kim, Hyun-Ju Chung, Young Joon Kim, Ok-Su Kim

Dept. of Periodontology, College of Dentistry and Dental Science Research Institute,
Chonnam National University

As the periodontal ligament cells show similar phenotype with osteoblasts, periodontal ligament cells are thought to play an important role in alveolar bone remodeling. According to recent studies, receptor activation of nuclear factor κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) are expressed in periodontal ligament cells during tooth movement. Also periodontal ligament cells is known to play an important role in the progression of periodontal disease.

This study was designed how the expression of RANKL and OPG in periodontal ligament cells was regulated by IL-1β in the concentration of 0.01~10 ng/ml.

The results are as follows;

1. Periodontal ligament cells which stimulated by IL-1β increased soluble RANKL synthesis by dose-dependent pattern in the concentration of 0.01~10 ng/ml.
2. IL-1β induced mRANKL expression in dose-dependent manner in the concentration of 0.01~5 ng/ml.
3. mOPG expression was not to be influenced by IL-1β.

These results suggested that rat periodontal ligament cells could regulate osteoclastogenesis by stimulation of production of RANKL.

Key words: RANKL, OPG, periodontal ligament cell