

Nuclear Factor I-C 과발현과 발현억제가 MDPC-23 상아모세포주의 상아질 기질유전자 발현에 미치는 영향

배현숙[†] · 조영식
남서울대학교 치위생학과

The Effect of Over-expression and Inactivation of Nuclear Factor I-C on the Dentin Matrix Gene Expression of MDPC-23 Odontoblasts

Hyun-Sook Bae[†] and Young-Sik Cho

Department of Dental Hygiene, Namseoul University, Cheonan 331-707, Korea

Abstract Nuclear factor I-C (NFI-C) null mice demonstrated aberrant odontoblast differentiation and abnormal dentin formation. In order to elucidate the mechanisms responsible for these changes, we evaluated the expression of dentin matrix gene after over-expression and inactivation of NFI-C in MDPC-23 cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Collagen type I (Col I), osteocalcin (OC), and dentin sialophosphoprotein (DSPP) expression was decreased after inactivation of NFI-C. However, bone sialoprotein (BSP) expression was dramatically increased after inactivation of NFI-C. ALP and DMP4 expression was not changed after inactivation of NFI-C. The expression of alkaline phosphatase (ALP) and dentin matrix protein 4 (DMP4) was increased after over-expression of NFI-C, while Col I, OC, DSPP, and BSP expression was decreased. These findings suggest that odontoblasts after loss of NFI-C lost the phenotype of odontoblasts and acquired those of osteoblasts.

Key words NFI-C, Odontoblast, Over-expression, Inactivation, Gene expression

서 론

치아는 많은 부분을 차지하는 상아질, 치관부위의 상아질을 덮는 법랑질, 치근부위의 상아질을 덮고 있는 무기물질과, 소성결합조직으로 이루어진 치수복합체로 구성되어 있다. 치아의 발생은 치아상피(dental epithelium)와 신경능선(neural crest) 유래의 외배엽성간엽세포(ectomesenchymal cell) 사이의 상호작용을 통해 이루어지는 복잡하지만 잘 조화를 이루어야 하는 과정이다¹⁻⁴. 치아상피는 외치아상피(outer dental epithelium)와 내치아상피(inner dental epithelium)로 나뉘고 나뉜 후 내치아상피가 법랑모세포로 분화하는 반면에, 외배엽성간엽세포는 치아유두(dental papilla)를 형성한 후 전상아모세포(preodontoblast) 단계를 거쳐 상아모세포로 분화한다⁵. 상아모세포와 법랑모세포에 의한 치관의 형성이 끝난 직후 내치아상피와 외치아상피 두층으로 이루어진 Hertwig 상피근초(Hertwig's epithelial root sheath)가 치근을 따라서 미분화 외배엽성

간엽세포인 치아유두 세포로부터 상아모세포의 분화를 유도하여 치근상아질을 형성한다⁶.

상아모세포는 유기기질을 합성 분비하고 이어서 무기질을 침착하는 방법으로 상아질을 형성하며, 이 과정에서 세포질돌기를 포함하는 상아세관이 만들어 진다⁷. 상아질의 유기기질은 대부분이 I형 아교질(type I collagen)로 구성되어 있으며, 이 아교질들 사이의 공간을 소량의 비아교질성 기질단백질(noncollagenous matrix protein)이 채우고 있다. 비아교질성 기질단백질은 그 양은 적으나 상아질의 특성을 결정하거나 상아모세포의 분화를 조절하는 등의 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다⁸. 상아모세포 분화과정에서 전상아모세포는 비아교질성 기질단백질인 I형 아교질과 알칼리성 인산분해효소 (ALP) 및 osteocalcin (OC)을 발현한다. 반면에, 분화된 상아모세포는 전상아모세포가 발현하는 것들 이외에 dentin-sialophosphoprotein (DSPP), dentin matrix protein 1 (DMP1), DMP2, DMP4, bone sialoprotein (BSP), matrix extracellular phosphorylated protein (MEPE) 및 osteopontin (OPN)을 합성 분비한다^{9,10}. 그러나 아직까지 상아모세포의 분화과정이나 상아질 기질단백질의 발현을 조절하는

[†]Corresponding author
Tel: 010-3616-5374
Fax: 041-580-2927
E-mail: clearbae@paran.com

인자에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

Nuclear factor I (NFI)계 전사인자들은 처음에는 시험관에서 adenovirus의 DNA 복제에 필요한 단백질로 발견되었으나, 최근에는 이들이 다양한 기관들의 발생에 필수적인 인자들로 작용하는 것으로 알려지고 있다¹¹⁻¹⁴. NFI 유전자계는 척추동물에서는 NFI-A, NFI-B, NFI-C 및 NFI-X의 네 가지 유전자들로 이루어져 있으나, *Drosophila melanoster*와 *Caenorhabditis elegans*에서는 하나의 NFI 유전자로 구성되어 있다¹⁵⁻¹⁷. 반면에 단세포 기관에서는 NFI 유전자가 없다¹⁸. 생쥐에서 NFI-A 유전자가 없으면 뇌의 발생에 이상이 생기며¹⁹, NFI-B 유전자가 없으면 폐의 성숙과 뇌 발생의 이상이 초래된다²⁰. NFI-X 유전자가 없는 생쥐는 뇌와 골격계의 발생의 이상이 초래된다²¹.

Steele-Perkins 등²²은 NFI-C 유전자가 없으면 구치는 치관부는 정상이지만 치근이 짧거나 비정상적으로 형성되고, 전치부도 부러지기 쉽게 변형되거나 이상이 발생한다고 하여 NFI-C가 치근 상아질 형성과정 즉 상아모세포의 분화과정에서 중요한 역할을 함을 시사하였다. 최근에 Lee 등²³은 NFI-C 결손 생쥐의 비정상적인 상아모세포는 뼈의 특성을 나타내는 BSP promoter의 활성이 증가한다고 하여 NFI-C에 의한 상아질 기질단백질의 발현조절 가능성을 시사하였다.

본 연구는 상아모세포의 분화와 상아질 형성과정에서 필수적인 인자로 알려진 NFI-C에 의한 상아모세포 기질단백질의 발현조절을 알아보기 위하여, MDPC-23 상아모세포주²⁴에 NFI-C 유전자를 주입하여 과발현시키거나 RNA interference 기법으로 NFI-C의 발현을 억제시킨 후 상아질 기질단백질 유전자들의 발현을 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 기법으로 분석하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 Transfection

상아모세포주인 MDPC-23을 60 mm dish에 2.5×10^5 cells의 밀도로 seeding, 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)과 항생제 (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Gentamycin 50 µg/ml 및 fungizone 2.5 µg/ml)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)에서 하루 동안 배양하였다. 세포가 세포 배양기에서 60~70% 정도 증식한 것을 확인한 후 Lipofectamine reagent와 plus reagent (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)에 control vector (pLKO.1 control)와 RNAi NFIC plasmid (pLKO.1-NFIC shRNA) 그리고 NFIC over (pCH-NFI-C)을 각각 혼합한 다음 Opti-MEM (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 넣고 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 상태의 세포 배양기에서 5~6시간 동안 배양

한 후 10% FBS, 항생제가 포함된 DMEM 배양액에서 3일간 배양하였다.

2. Confocal Microscopy

MDPC-23 세포를 cover slip에서 50~60% 세포증식 상태가 되도록 배양한 후 Lipofectamine reagent와 plus reagent (Gibco BRL, Rockville, USA)에 control vector (pLKO.1 control)와 RNAi NFIC plasmid (pLKO.1-NFIC shRNA) 그리고 NFIC over (pCH-NFI-C) 유전자를 transfection하였다. 72시간 후 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 다음 4% paraformaldehyde로 20분간 고정하고 다시 PBS로 10분간 3회 세척하였다. 일차 항체는 rabbit polyclonal anti-NFIC (1:100 dilution) 항체를 사용하여 실온에서 1시간동안 처리하였다. PBS로 10분간 3회 세척 후 이차 항체로서 goat anti-rabbit IgG-FITC (Invitrogen, Rockville, MD, USA)를 실온에서 45분 동안 처리하고 PBS로 10분간 3회 세척하였다. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 대조염색하였다. PBS로 10분간 3회 세척 후 형광성 봉입제로 봉입하여 confocal microscope (F300, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

3. Total RNA 추출 및 RT-PCR 분석

Total RNA는 각각의 유전자를 transfection한 MDPC-23 세포에서 Trizol reagent (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출된 total RNA 5 µg Superscript one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였고, 유전자 특이적

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Tm (°C)
DSPP	Sense Atagcaccacccatgaggct	550	60
	Antisense Cttttgtgctttgttggg		
DMP-4	Sense Ccagtggctgtaggatgat	438	60
	Antisense Tgaaggtctcattcccgaac		
NFI-C	Sense Gacctgtacctggcctctttg	914	58
	Antisense Tttccacaaaaatgcaggctgg		
ALP	Sense Cctcggagatggtggaggt	453	62
	Antisense Gcttctccaccgtgggtct		
BSP	Sense Aagaaaatggagacggcgat	489	49
	Antisense Cacctgttcagtgcgctt		
OC	Sense Ccacgccttcattccaag	461	63
	Antisense Ggcagagagagaggacaggg		
Type I/collagen	Sense Taagttgccaagaacgtgcc	494	55
	Antisense Aattgaaagccaggaggcat		
GAPDH	Sense Accacagtcctcatcac	452	60
	Antisense Tccaccacctgtgctgt		

primer (Table 1)를 이용하여 94°C:30s, 58°C:30s, 72°C:45s에서 32 cycle의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 생성물은 1.2% 아가로스 겔에 전기 영동하여 유전자 발현을 확인하였다.

4. Densitometry 분석

RT-PCR을 수행한 각 유전자의 densitometry 분석은 Gel-Doc system (Bio-rad laboratory, Inc. CA, USA)의 differential analysis 프로그램을 사용하여 각 분석하였고, 그 결과는 GAPDH로 표준화하였다.

결 과

1. NFI-C 발현억제와 과발현에 따른 MDPC-23 세포의 형태학적 변화와 NFI-C 단백질의 발현 변화

대조군의 MDPC-23 상아모세포는 confluence 상태에서 다각형 모양으로 섬유모세포와 유사한 형태학적 소견을 보였다 (Fig. 1A). NFI-C 발현이 억제된 MDPC-23 세포는 대조군에 비하여 둥근 형태를 나타냈다 (Fig. 1B). 반면에, NFI-C가 과발현된 MDPC-23 세포는 세포의 모양이 원주형 형태로 변화하였으며, 세포질에 수직상 돌기를 나타내는 세포도 상당 수 관찰되었다 (Fig. 1C).

대조군의 MDPC-23 세포는 세포의 핵과 세포질에 과립 모양의 NFI-C 단백질의 발현되었으나 (Fig. 1D), NFI-C 발현이 억제된 MDPC-23 세포에서는 NFI-C 단백질의 발현이 현저히 감소되었다 (Fig. 1E). NFI-C가 과발현된 MDPC-23 세포는 NFI-C 단백질이 세포질에서 전체적으로 관찰되었으며, 핵에서도 대조군에 비하여 NFI-C 단백질의 발현이 더욱 뚜렷이 관찰되었다 (Fig. 1F).

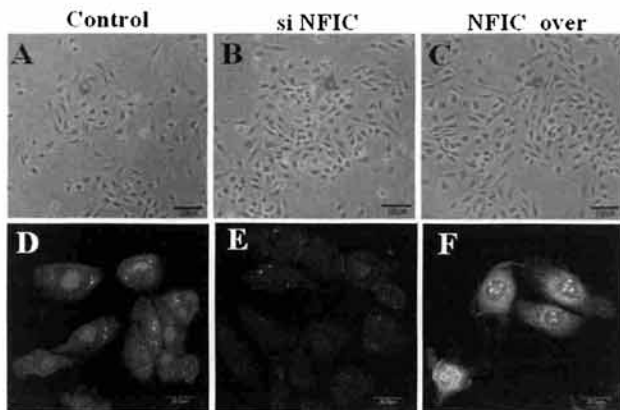


Fig. 1. Morphology and NFI-C protein localization after overexpression or inactivation of NFI-C. The MDPC-23 cells cultured on coverslip were transfected with control vector, NFI-C over, and NFI-C RNAi plasmid. (A, B, C) Photographs were taken with a light microscope. Bars 100 µm. (D, E, F) NFI-C protein localization was detected by immunostaining with confocal microscope after NFI-C overexpression (NFI-C over) or inactivation (si NFI-C). Bars 20 µm.

2. NFI-C 발현억제와 과발현에 따른 제1형교원질, ALP, 및 OC 상아질 기질 유전자의 발현

MDPC-23 세포에 RNAi NFI-C plasmid (pLKO.1-NFI-C shRNA)와 NFI-C over plasmid (pCH-NFI-C)를 transfection한 후 control vector (pLKO.1 control)를 transfection한 대조군과 NFI-C mRNA의 발현을 비교 관찰한 결과, NFI-C 발현 억제 후에는 대조군에 비하여 NFI-C mRNA의 발현이 현저히 감소하였으나, NFI-C 과발현 후에는 NFI-C mRNA의 발현이 현저히 증가하였다 (Fig 2A, 2B). ALP mRNA의 발현은 NFI-C 발현 억제 후에는 대조군과 비교하여 별다른 차이가 없었으나, NFI-C 과발현한 후에는 현저히 증가하였다 (Figs. 2A, 2C). 반면에, I형 collagen mRNA는 NFI-C 발현 억제와 과발현

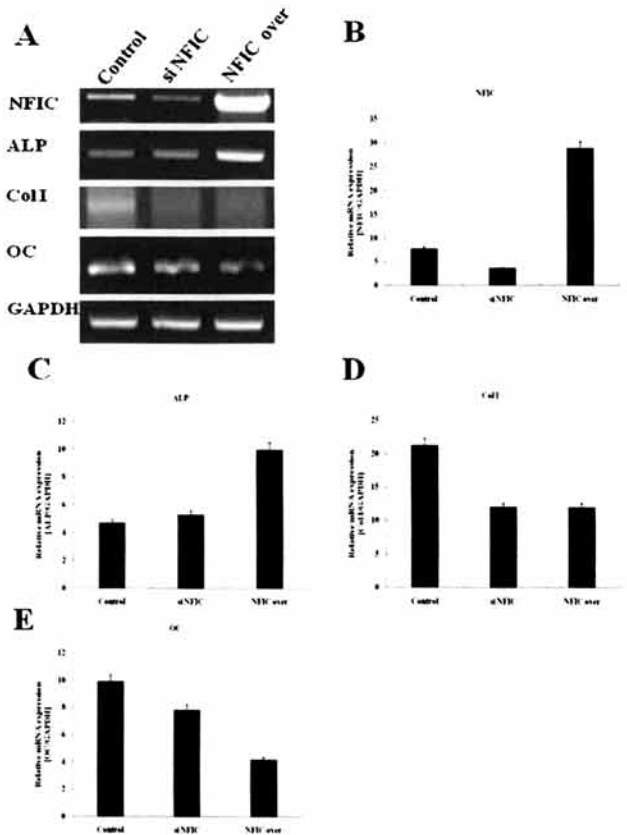


Fig. 2. Expression of dentin matrix genes representing differentiating odontoblasts analyzed by RT-PCR. The MDPC-23 cells cultured plated on 60 mm culture dishes at a density of 2.5×10⁵ cells, and were transfected with control vector, NFI-C over (NFI-C over), and NFI-C RNAi plasmid (si NFI-C). The cells were allowed to grow in the appropriate medium for 3 days, and RT-PCR analysis was performed. (A) Electrophoresis of RT-PCR products. (B) Expression of NFI-C mRNA expression after overexpression or inactivation of NFI-C. (C) Expression of ALP mRNA expression after overexpression or inactivation of NFI-C. (D) Expression of type I collagen (Col I) mRNA expression after overexpression or inactivation of NFI-C. (E) Expression of OC mRNA expression after overexpression or inactivation of NFI-C.

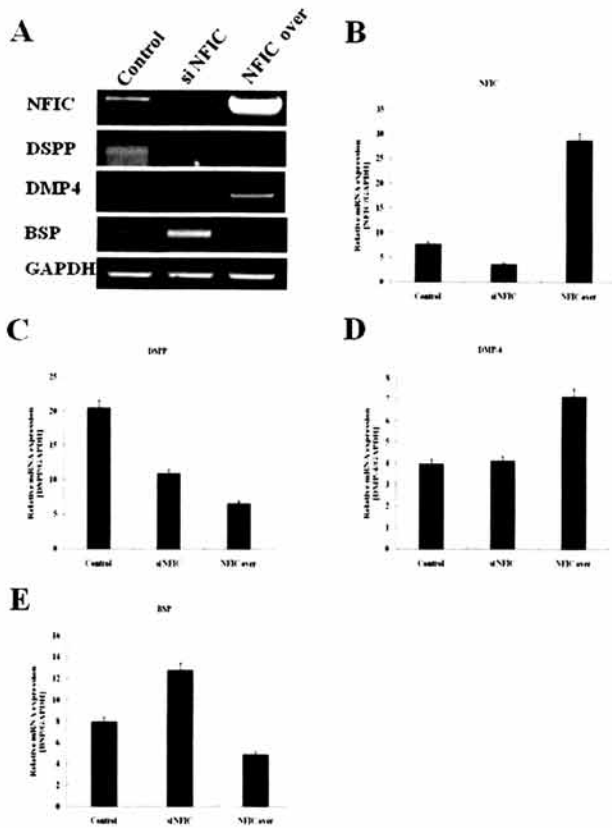


Fig. 3. Expression of dentin matrix genes representing fully differentiated odontoblasts analyzed by RT-PCR.

The MDPC-23 cells cultured plated on 60 mm culture dishes at a density of 2.5×10^5 cells, and were transfected with control vector, NFIC over (NFIC over), and NFIC RNAi plasmid (siNFIC). The cells were allowed to grow in the appropriate medium for 3 days, and RT-PCR analysis was performed.

(A) Electrophoresis of RT-PCR products.

(B) Expression of NFIC mRNA expression after overexpression or inactivation of NFIC.

(C) Expression of DSPP mRNA expression after overexpression or inactivation of NFIC.

(D) Expression of DMP-4 mRNA expression after overexpression or inactivation of NFIC.

(E) Expression of BSP mRNA expression after overexpression or inactivation of NFIC.

후에 대조군에 비하여 현저히 감소하였다 (Figs. 2A, 2D). OC mRNA는 NFIC 발현억제와 과발현 후에 대조군에 비하여 감소하였는데, 발현억제 보다 과발현 후에 그 발현이 훨씬 더 감소하였다 (Figs. 2A, 2E).

3. NFIC 발현억제와 과발현에 따른 DSPP, DMP-4, 및 BSP 상아질 기질 유전자의 발현

NFIC mRNA의 발현은 NFIC 발현억제 후에는 대조군에 비하여 감소하였으나, NFIC 과발현 후에는 현저히 증가하였다 (Figs. 3A, 3B). DSPP mRNA는 대조군에 비하여 NFIC 발현억제와 과발현 후에 감소하였는데, 과발현 후에 그 발현이 더 감소하였다 (Figs. 3A, 3C). DMP-4 mRNA의 발현은 NFIC 발현 억제 후에는 대조군과 비

교하여 차이가 없었으나, NFIC 과발현에 의하여 현저히 증가하였다 (Figs. 3A, 3D). BSP mRNA는 대조군에 비하여 NFIC 발현 억제 후에는 현저히 증가하였으나, NFIC 과발현 후에는 다소 감소하였다 (Figs. 3A, 3E).

고찰

외배엽성간엽세포로부터 전상아모세포(preodontoblast)를 거쳐 상아모세포가 분화하는 데에는 전법랑모세포(preameloblast)의 존재가 필수적이다³⁾. 외배엽성간엽세포가 전상아모세포로 분화하면 세포가 길어지고, 세포가 기저부에 위치하며, 극성을 띄게 되고, 골지체 (Golgi complex)가 핵 위에 위치하며, 조면내형질세망 (rER)이 세포의 가장 자리에 위치하게 된다. 전상아모세포가 상아모세포로 분화하면 상아모세포의 원섬유에 부착 결합 (adherent junction)이나 치밀 결합 (tight junction)과 같은 세포간 결합장치 (intercellular junctional complex)가 발달하게 된다²⁵⁾. 본 실험에서 사용한 MDPC-23 세포주는 Hank 등²⁴⁾이 CD-1 흰쥐 대구치의 치아유두 세포를 불멸화하여 만든 세포주로, Sun²⁶⁾등은 분화배지에서 배양하면 세포들이 분화하여 상아모세포의 특성을 나타낸다고 하였다.

상아모세포의 분화 관련인자인 NFIC의 결손은 생쥐 상아질 형성과정에서 상아모세포를 비정상적으로 분화시키고 뼈의 특성이 강한 골양상아질을 형성을 통하여 치근 형성의 장애를 초래하는 것으로 알려지고 있다^{27,28)}. Park 등²⁹⁾은 NFIC 결손 생쥐의 상아모세포는 형태학적으로 세포 극성과 방향성을 상실한 비정상적인 세포로 그 결과 비정상적인 상아질을 형성한다고 하였으며, Lee 등³⁰⁾은 NFIC 결손 생쥐 구치의 치근과 전치부 설측면에서 극성이 상실되고 둥근 형태의 비정상적인 상아모세포들이 세포사이 결합장치가 상실되면서 결과적으로 상아모세포 돌기와 상아세관이 없는 비정상적인 상아질을 형성한다고 하였다. 이러한 결과는 NFIC의 결손에 의하여 상아모세포의 표현형에 변화가 생기는 것을 의미하는 것이어서, NFIC와 상아질의 특성을 결정하는 상아질 기질단백질의 연관성에 대한 연구가 필요하다.

Dentin sialophosphoprotein (DSPP)은 비교원질성 단백질에 속하는 대표적인 상아질-특이 단백질로 하나의 유전자로부터 dentin sialoprotein (DSP)과 dentin phosphoprotein (DPP) 그리고 dentin glycoprotein (DGP)의 세 가지 단백질을 합성하며 상아질의 석회화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{31,32)}. DPP는 DSPP의 C-terminal 단백분해산물이며, DSP는 N-terminal 단백분해산물이고 DGP는 이 분자의 가운데에 존재한다. Bone sialoprotein (BSP) 유전자는 기본적으로 석회화 결합조직에 제한적으로 발현되며, 이는 골, 치아, 백악질 형성 초기에 높게 나타난다. BSP는 세포부착을 중재할 수 있는 단백질로서 세포의 기질에 축적되며, 수산화인회석 결정을 유해화한

다^{32,33}). DSPP와 다르게 BSP는 골의 석회화 과정에 관여하는 인자로 알려져 있어³⁴), BSP와 DSPP가 상아질과 골을 구분하는 실험에 많이 이용된다. 최근에 Lee 등²³)은 MDPC-23 세포에서 NFI-C가 발현억제되거나 과발현되면 DSPP promoter 활성이 감소하는데, 그 감소는 과발현 때에 더욱 현저하다고 하였다. 반면에, BSP promoter의 활성은 NFI-C가 발현억제 되면 증가하였지만, NFI-C가 과발현 되면 감소한다고 하였다. 본 연구에서는 상아질과 뼈의 특이 인자들로 알려진 DSPP와 BSP 유전자의 promoter 활성이 NFI-C에 의하여 조절되는 것, mRNA 발현과의 상관성 및 상아질에 존재하는 다른 다양한 기질유전자 발현의 NFI-C의 조절 등을 알아보고자 하였다. DSPP mRNA의 발현은 NFI-C의 발현이 억제되거나 과발현 되면 감소하였고, BSP mRNA의 발현은 NFI-C가 발현억제 되면 증가하였지만 NFI-C가 과발현 되면 감소하였다. 이는 Jung 등³⁵)의 DSPP와 BSP promoter 활성도 및 mRNA 발현 연구 결과와 일치한다. Bae 등³⁶)도 MDPC-23 세포에 NFI-C를 발현억제 시킨 3일 후에는 BSP mRNA의 발현이 확인된다고 하였다. 이와 같은 연구 결과들은 흰쥐 BSP 유전자의 promoter에 NFI-C binding site와 TGF- β responsive element가 동일한 부위에 존재해서 서로 중첩 (overlap)되어 있다는 사실과도 관련이 있다^{33,37}). 결과적으로 NFI-C가 존재할 때는 NFI-C가 BSP promoter에 결합하여 TGF- β 의한 BSP promoter의 활성을 억제하지만, NFI-C가 없을 때에는 TGF- β , BSP promoter의 활성을 촉진하는 것으로 볼 수 있다. Thyagarajan 등³⁸)은 TGF- β 1을 과발현 시킨 형질전환 생쥐는 상아모세포가 세포 극성이 상실되며, 골양상아질과 유사한 비정상적인 상아질에 세포가 함입되고, DSPP mRNA가 발현되지 않는다고 하였다. 이는 NFI-C 결손 생쥐의 상아모세포의 분화와 형태학적으로 유사한 것으로, TGF- β 1 과발현 생쥐와 NFI-C 결손 생쥐의 상아모세포들이 골모세포와 유사한 세포로 표현형의 변환이 나타날 수 있음을 의미한다. 또한 이 연구 결과는 NFI-C 결손으로 초래된 상아모세포의 분화 이상이 다른 유전자들 즉 TGF- β 1과 같은 인자들에 대한 간접작용의 결과에서 기인할 수 있음을 시사한다. 그러나, NFI-C 발현억제와 과발현에서 DSPP promoter의 활성이 대조군에 비하여 감소한 것은 BSP promoter의 NFI-C와 TGF- β 반응영역이 중첩된 것처럼 DSPP promoter도 NFI-C와 TGF- β 반응영역이 중첩된다는 논리로는 설명할 수 없다. 따라서 이에 대하여는 상아모세포의 분화시기를 구분하여 DSPP와 NFI-C의 상호 작용을 면밀히 연구하는 NFI-C에 의한 DSPP의 조절 기전의 보완 연구가 필요하다.

상아모세포의 분화과정에서 I형 아교질과 ALP 및 OC은 전상아모세포 단계에서 발현되는 초기 분화 표지자이다⁵). 일반적으로 비아교성 기질단백질은 촉진자나 억제제 혹은 안정제로서 무기질 침착을 조절하는데, 분포에 따라

각기 기능이 다르다. I형 아교질은 원섬유(fibrils) 사이의 작은 구멍 속에 무기질의 많은 부분(약 56%)을 수용하는 뼈대로서 작용한다⁹). 알칼리성인산분해효소 (ALP)의 활성은 모든 무기질 침착 조직의 형성과 관련이 있다. 이 효소는 모든 경조직에서 분포 양상이 유사하여, 혈관과 경조직 형성 세포의 세포막에 분포하며, 알칼리성 pH에서 유기기로부터 인산이온을 가수분해하는 기능을 갖고 있는 것으로 잘 알려져 있지만 무기질 침착에서 구체적으로 어떤 역할을 하는지에 관하여는 확실치 않다⁸). OC은 골모세포, 상아모세포, 백악모세포의 성숙도, 분화 정도에 대한 지표가 되며, 무기질 침착의 정도를 조절하는 유전자이다³⁹). 본 연구에서는 I형 아교질과 OC의 발현은 NFI-C 발현억제나 과발현에 의하여 모두 감소하였다. 이와 관련하여 Miyazaki 등⁴⁰)은 Runx2 과발현 형질전환 생쥐는 상아모세포의 분화에 이상이 초래되어 상아모세포가 골모세포와 유사한 형태로 바뀌고 골양상아질을 형성한다고 하였으며, 이 과정에서 I형 아교질과 OC의 발현은 현저히 감소한다고 하였다. 이와 같은 기질단백질 유전자들의 발현 변화는 NFI-C의 결손과 Runx2 과발현이 상아모세포의 표현형을 상아모세포에서 골모세포와 유사한 세포로 변화 시키면서 나타난 결과에서 기인한 것으로 볼 수 있다.

DMP-4는 DSPP와 상아모세포 분화과정에서 분화된 상아모세포에서 발현되는 인자로 알려져 있다. DMP-4는 칼슘결합영역을 포함하고 있는 상아질 기질단백질로 법랑모세포나 골모세포에서는 약하게 발현되지만 상아모세포에서는 강하게 발현되며, 미분화간엽세포를 상아모세포양 세포로 분화 시킬 수 있는 중요한 인자로 알려져 있다⁴¹). 본 연구에서 NFI-C 과발현에 의하여 DMP-4 mRNA의 발현이 현저히 증가하였는데, 이는 앞으로 두 인자의 상호작용의 규명이 상아모세포의 분화와 상아질 형성 기전을 이해하는 중요한 연구 분야가 될 수 있음을 시사한다.

본 연구에서 상아모세포의 분화과정에서 NFI-C의 발현억제나 과발현은 상아질에 특이적인 기질단백질 유전자들의 발현을 억제하고 골모세포의 특성을 나타내는 기질단백질 유전자들의 발현을 증진하였다. 이 결과는 NFI-C 전사인자의 이상이 생기면 상아모세포가 골모세포양 세포로 그 표현형이 바뀌는 것으로 보아 NFI-C가 상아모세포의 분화와 생리적인 상아질 형성에 필수적인 요소임을 나타내며, 따라서 이 결과는 상아모세포의 분화유도인자를 동정하기 위한 연구에도 응용 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 상아모세포의 분화와 상아질 형성과정에서 필수적인 인자로 알려진 NFI-C가 상아모세포 기질단백질

의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, MDPC-23 상아모세포에 NFI-C 유전자를 과발현 시키거나 발현억제시킨 후 상아질 기질단백질 유전자들의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MDPC-23 세포에서 NFI-C mRNA는 NFI-C 과발현 후에 현저히 증가하였으며, NFI-C 발현억제 후에는 감소하였다.
2. NFI-C가 과발현된 MDPC-23 세포는 NFI-C 단백질이 핵과 세포질에서 뚜렷이 관찰되었으나, NFI-C 발현이 억제된 MDPC-23 세포에서는 NFI-C 단백질의 발현이 대조군에 비하여 현저히 감소하였다.
3. NFI-C 발현이 억제된 MDPC-23 세포는 대조군에 비하여 I형 아교질, OC, 및 DSPP mRNA의 발현은 감소하였으나 BSP의 발현은 증가하였다. ALP와 DMP4의 발현은 NFI-C 발현억제 후에도 변화가 없었다.
4. NFI-C가 과발현된 MDPC-23 세포에서는 ALP와 DMP4 mRNA의 발현은 대조군에 비하여 증가하였으며 I형 아교질, OC, DSPP, 및 BSP의 발현은 감소하였다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 남서울대학교 연구비지원을 받아 연구 되었습니다.

참고문헌

1. Mina M, Kollar EJ: The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 32(2): 123-127, 1987.
2. Thesleff I, Partanen AM, Vainio S: Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the roles of extracellular matrix, growth factors, and cell surface receptors. *J Craniofac Genet Dev Biol* 11(4): 229-237, 1991.
3. D'Souza RN et al.: Cbfal is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 126(13): 2911-2920, 1999.
4. Peters H, Balling R: Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet* 15(2): 59-65, 1999.
5. Arana-Chavez VE, Massa LF: Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol* 36(8): 1367-1373, 2004.
6. Zeichner-David M et al.: Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 228(4): 651-663, 2003.
7. Holland GR: The extent of the odontoblast process in the cat. *J Anat* 121(1): 133-149, 1976.
8. Linde A, Goldberg M: Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(5): 679-728, 1993.
9. Begue-Kim C et al.: Comparative analysis of TGF- β s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 38(3): 405-420, 1994.
10. Sasaki T, Garant PR: Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec* 245(2): 235-249, 1996.
11. Chaudhry AZ, Vitullo AD, Gronostajski RM: Nuclear factor I-mediated repression of the mouse mammary tumor virus promoter is abrogated by the coactivators p300/CBP and SRC-1. *J Biol Chem* 274(11): 7072-7081, 1998.
12. Elateri I, Muller-Weeks S, Caradonna S: The transcription factor, NFI/CTF plays a positive regulatory role in expression of the hSMUG1 gene. *DNA Repair* 2(12): 1371-1385, 2003.
13. Gronostajski RM: Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* 249(1-2): 31-45, 2000.
14. Gronostajski RM et al.: Stimulation of transcription in vitro by binding sites for nuclear factor I. *Nucleic Acids Res* 16(5): 2087-2098, 1988.
15. Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM: Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev Dyn* 208(3): 313-325, 1998.
16. Chaudhry AZ, Vitullo AD, Gronostajski RM: Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters. *J Biol Chem* 273(29): 18538-18546, 1999.
17. Mukhopadhyay SS et al.: Differential interactions of specific nuclear factor I isoforms with the glucocorticoid receptor and STAT5 in the cooperative regulation of WAP gene transcription. *Mol Cell Biol* 21(20): 6859-6869, 2001.
18. Fletcher CF et al.: Exon structure of the nuclear factor I DNA-binding domain from *C elegans* to mammals. *Mamm Genome* 10(4): 390-396, 1999.
19. Ling G et al.: Transcriptional regulation of rat CYP2A3 by nuclear factor 1: identification of a novel NFI-A isoform, and evidence for tissue-selective interaction of NFI with the CYP2A3 promoter in vivo. *J Biol Chem* 279(27): 27888-27895, 2004.
20. Shu T et al.: Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nf/a knock-out mice. *J Neurosci* 23(1): 203-212, 2003.
21. Driller K et al: Nuclear factor I X deficiency causes brain malformation and severe skeletal defects. *Mol Cell Biol* 27(10): 3855-3867, 2007.
22. Steele-Perkins G et al.: Essential Role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Mol Cell Biol* 23(3): 1075-1084, 2003.
23. Lee DS et al.: NFI-C is essential for odontogenic cell proliferation and odontoblast differentiation during tooth root development. *J Biol Chem* 284(25): 17293-17303, 2009.
24. Hanks CT, et al.: Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 37(3-4): 233-249, 1998.
25. Garant PR: The organization of microtubules within rat odontoblast processes revealed by perfusion fixation with glutaraldehyde. *Arch Oral Biol* 17(7): 1047-1058, 1972.
26. Sun ZL et al.: Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connective Tissue Res* 37(3-4): 251-261, 1998.
27. Yoon SH et al.: Effect of NFI-C on the expression of smad and TGF- β R1. *Kor J Anat* 40(2): 127-135, 2007.
28. Lee DS et al: The effect of NFI-C disruption on the gene expression of dental pulp cells in mice: cDNA microarray analysis. *Kor J Oral Maxillofac Pathol* 32(3): 129-138, 2008.

29. Park JC, et al.: Nfic gene disruption inhibits differentiation of odontoblasts responsible for root formation and results in formation of short and abnormal roots in mice. *J Periodontol* 78(9): 1795-1802, 2007.
30. Lee TY et al.: Disruption of nfic causes dissociation of odontoblasts by interfering with the formation of intercellular junctions and aberrant odontoblast differentiation. *J Histochem Cytochem* 57(5): 469-476, 2009.
31. Feng JQ et al.: Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem* 273(16): 9457-9464, 1998.
32. Rutherford RB et al.: Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 38(7): 571-576, 1993.
33. Ogata Y et al.: Transforming growth factor-beta 1 regulation of bone sialoprotein gene transcription: identification of a TGF-beta activation element in the rat BSP gene promoter. *J Cell Biochem* 65(4): 501-512, 1997.
34. Chien H-H, Lin W-L, 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(6): 301-309, 1999.
35. Jung HK et al.: Expression of DSPP and BSP mRNAs during odontoblast differentiation in the NFI-C (-/-) mice. *J Kor Acad Pediatric Dent* 2(4): 662-669, 2005.
36. Bae HS et al.: Role of nuclear factor I-C during odontoblast differentiation. *Kor J Oral Maxillofac Pathol* 29(2): 83-92, 2005.
37. Unterbrink A et al.: TGF beta-1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. *Connect Tissue Res* 43(2-3): 354-358, 1998.
38. Thyagarajan T et al.: Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in teeth. *J Biol Chem* 276(14): 11016-11020, 2001.
39. Papagerakis P et al.: Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 30(2): 377-385, 2002.
40. Miyazaki T et al.: Inhibition of the terminal differentiation of odontoblasts and their transdifferentiation into osteoblasts in Runx2 transgenic mice. *Arch Histol Cytol* 71(2): 131-46, 2008.
41. Hao J et al.: Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation. *J Biol Chem* 282(21): 15357-65, 2007.

(Received August 26, 2009; Revised October 16, 2009;
Accepted October 19, 2009)

