

하악골의 발육중인 생쥐에서 기능력의 변화가 특이-유전자 발현에 미치는 영향

김형태 · 박주철* · 이창섭 · 박현동

조선대학교 치과대학 소아치과학 교실, 구강조직학 교실* 및 구강생물학연구소

국문초록

기능력은 뼈의 형성, 유지 및 개조 이외에도 치아이동, 교정치료, 기능성 악교정장치의 사용 등과 관련한 치주인대세포의 특성 변화 등에 중요한 영향을 미친다. 또한, 하악과두에서도 기능력의 변화에 따라서 다양한 특성의 변화가 나타난다.

본 연구에서는 ICR 생쥐를 8주 동안 soft-diet과 hard-diet의 식이 조절을 통해 기능력의 변화를 유도하여, 기능력의 변화와 관련한 특이 유전자를 검출하기 위하여 subtractive hybridization, northern 분석 및 mRNA in-situ hybridization 등의 실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Soft-diet군과 hard-diet군의 subtractive hybridization을 통하여 총 39개의 clone을 얻었고 이중에서 11개의 서로 다른 hard-diet군 특이 후보 유전자들을 분리하였다.
2. 11개의 후보 유전자들 중에서 homology 검색과 northern 분석을 통하여 기능력과 관련이 있을 것으로 생각되거나 hard-diet군에서 mRNA가 선택적으로 발현되는 FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22 유전자를 선택하였다.
3. Soft-diet군과 hard-diet군의 형태학적 분석에서 soft-diet군은 hard-diet군에 비하여 골모세포의 활성화와 골개조의 특성은 저하된 것으로 관찰되었으나, 하악과두의 연골성골화 과정은 오랜 시간동안 지속되는 것으로 나타났다.
4. FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22 유전자의 cRNA 탐침자를 이용한 in-situ hybridization에서 4개의 유전자의 mRNA들은 hard-diet군의 세포들에서는 강하게 발현되었으나 soft-diet군의 세포들에서는 그 발현이 미약하거나 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22 유전자들은 대부분이 기능이 거의 알려져 있지 않는 것들로 기능력의 변화 과정에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되나 앞으로 보완 연구를 통하여 각각의 유전자들의 보다 정확한 기능을 이해하는 것이 필요 할 것으로 사료된다.

주요어 : 유동식, Hard-diet, 기능력, 특이 mRNA, 하악

I. 서 론

기능적 응력(functional stress)을 포함한 기계적 응력(mechanical stress)은 골의 형성, 유지 및 골 개조 과정에 영향을 끼쳐 골의 형태와 성질을 변화시키는데 중요한 역할을 한다. 또한, 구강내에서 치아맹출, 생리적, 교정적 치아이동, 저작활동에 따른 치조골과, 치주인대 및 측두하악과두의 적응 과정에서도 다양한 조직의 변화를 유발하는 주요한 인자로 작용하는 것으로 보고되고 있다¹⁻³⁾.

현재까지의 연구 결과에 의하면 기계적 응력이 골의 기질에 전달되면 골세포가 이를 인지하여 결과적으로 골모세포의 활성화와 과골세포에 의한 골 흡수가 일어나는데⁴⁾. 이 과정에서 초기

에 나타나는 물질로는 nitric oxide(NO)와 c/AMP가 있으며, 이어서 glutamate/aspartate transporter(GLAST), nitrous oxide synthetase(NOS)와 prostaglandin G/H synthetase(PGHS-2) 등의 효소가 발현된다고 하였다⁵⁻⁷⁾. 그러나 이러한 물질이나 효소들은 기계적 응력에 따른 골 개조과정에 직접 관여하는 골모세포와 과골세포의 활성화를 조절물질이라 생각할 수 있으며, 기계적 응력이 작용할 때 조직이나 세포의 변화를 직접 유도하지 못하기 때문에 기계적 응력과 관련한 새로운 관련 인자의 탐색이 필요하다.

신체에서 다양하게 발생하는 기계적 응력을 실험적으로 재현하여 신체의 조직 및 세포에 미치는 영향을 연구하는 방법들로는 석고 cast에 의한 골의 고정⁸⁾, 근육의 절단^{9,10)}, 기능적 교정

장치의 적용¹¹⁾, 발치¹²⁾, distraction osteogenesis의 응용⁷⁾, 식이 조절¹³⁾ 및 하악과두 절제술¹⁴⁾ 등의 다양한 방법이 있다. 그러나 이러한 방법들은 신체에서 다양한 방향으로 발생하는 기계적 응력을 제한하거나 재현하는 데 한계가 있을 뿐만 아니라 기능성이 골, 치아 및 하악과두에 미치는 영향을 복합적으로 이해하는 데에는 많은 문제점을 내포하고 있다¹⁵⁾. 최근에 Hinton¹³⁾은 생쥐를 음식물의 강도 조절 즉 soft-diet과 hard-diet를 통하여 악골에 가해지는 기능적 응력을 감소시키거나 없앨 수 있다고 하였다. 그러나, Smith 등¹¹⁾은 전치부에 의한 교합력의 60%가 측두하악관절에 전달되기 때문에 단순 식이조절에 기능적 응력 조절 실험은 적절하지 않다고 하였다.

어떤 조직이나 세포에서 선택적으로 발현되는 특정한 유전자를 검출하는 방법에는 differential display, microarray 및 subtractive hybridization 등이 알려져 있다¹⁶⁾. Subtractive hybridization 방법은 두 가지 세포나 조직을 비교하여 선택적으로 발현되는 유전자 단편들을 변형된 중합연쇄효소반응(PCR)을 통하여 검출해내기 때문에 세포와 조직간의 미세한 유전자 발현의 차이를 검출하는데 유용한 방법이다¹⁷⁾.

본 연구에서는 치아, 하악골 및 하악과두에서 동시에 실험적으로 유도된 기능력의 조직내 발현을 조절하고 기능력에 의해서 특이적으로 유발되는 유전자를 탐색하기 위하여, 생쥐를 soft-diet군과 hard-diet군으로 나누어 8주간 사육함으로써 정상적인 기능력 적용과 기능력 저하 상태를 유도하였다. 정상 기능력 적용과 기능력 저하 상태에의 하악골을 형태학적으로 관찰하고 하악골과 측두하악관절에서 RNA를 추출하여 subtractive hybridization, homology 검색 및 northern 분석을 통하여 정상 기능력 적용 상태에서 기능 저하 상태에 비하여 특이적으로 발현되는 특이 유전자 FS-s(Functional stress-specific)2, FS-s5, FS-s18, FS-s22를 검출하고 조직표본을 만들어 하악골, 치아 및 하악과두에서 특이 유전자들의 발현을 in-situ-hybridization 방법으로 확인하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 동물의 준비 및 식이조절

출생 6주된 ICR 생쥐 20마리를 암수 한 쌍 씩 서로 다른 사육장에 넣어 교배시켜 새로 출생한 암컷 생쥐들을 생후 23일이 지난 이유 시점에서 각 20마리씩 soft-diet군과 hard-diet군으로 나누어 Soft-diet군은 표준 생쥐 고형사료(Oriental East Co., LTD., Tokyo Japan)를 미세한 분말로 분쇄 한 후 종류수에 섞어서 죽 형태의 사료로 만들어 8주간 사육하고 hard-diet군은 soft-diet에서 사용된 것과 동일한 고형사료를 8주간 사육하였다. Soft-diet군과 hard-diet군 모두 종류수를 실험 기간 동안 섭취 시켰다. Soft-diet군은 식이 과정과 상관없이 전치부에 의한 교합력이 하악골에 작용하는 것을 제거하기 위하여 출생 후부터 상하악 전치부 치관의 1/3부위를 일주일에 2회

씩 전 실험 기간 동안 제거하였다.

2. 실험 동물 희생 및 RNA 추출

Soft와 hard-diet군 생쥐들을 8주간 사육한 후 척추 탈골 방법에 의하여 희생시켜 치아가 포함된 하악골을 적출하고 하악골에서 Trizol reagent(Life tech., Rockville, MD, USA)와 mRNA isolation kit(Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany)를 이용하여 Total RNA와 poly(A)⁺ RNA를 추출하였다.

3. Subtractive hybridization, subcloning 및 homology 검색

Soft-diet군과 hard-diet군의 하악골에서 추출한 poly(A)⁺ RNA를 이용하여 first strand cDNA를 합성 한 후 PCR-selected subtractive hybridization kit(Clontech Lab., Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 subtractive hybridization을 시행하였다. 분리된 후보유전자 단편들을 subcloning하고 sequencing하여 염기서열을 분석한 후 Blast search program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)으로 homology를 검색하였다.

4. Northern 분석

Soft-diet군과 hard-diet군의 하악골에서 추출한 15μg의 total RNA를 각각 0.8% agarose gel에 전기영동하고 nylon membrane(Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 blotting하였다. 후보 유전자를 탐침자로 $\{\alpha\text{-P}^{32}\}\text{-dCTP}$ (Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK)와 random priming kit(Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA)를 이용 labeling하여 30% formamide, 4X SSC, 1X Denhart's solution 및 SDS가 함유된 hybridization 용액에서 42°C, 16-20시간 incubation하고 X-ray film에 현상하여 mRNA 발현 결과를 확인하였다.

5. 조직 절편 제작 및 mRNA in-situ hybridization

8주간 식이 조절한 soft-diet군과 hard-diet군 생쥐들을 각각 5마리씩 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정하고, 하악과두를 포함한 하악골을 적출하였다. 10 % EDTA(ph 7.4) 용액에서 2주-4주간 털회한 후 통법에 따라 paraffin 포매하여 5μm 두께로 전치부에서부터 순차적으로 치아의 장축에 직각되게 박절하고 ethoxysilran-coated 슬라이드에 붙여 형태학적으로 관찰(Hematoxylin-Eosin stain)과 in-situ hybridization에 이용하였다.

cRNA probe로 이용할 DNA들은 선형화하고 Proteinase K 처리 후 DIG RNA labelling kit(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)와 T3 및 T7 RNA polymerase (Roche Molecular biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 sense와 antisense cRNA probe를 작성하였다. 절편을 xylene으로 탈 파라핀 처리하고 합수과정을 거친 후, 4% papaformaldehyde 용액에서 10분간 재고정하였다. Acetylation 용액(0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine-HCl, pH 8.0)에 10분간 처리한 후 탈수 및 탈지과정을 거쳐 공기 중에서 건조시켰다. 50% formamide, 10mM Tris-HCl, 200 μ g/ml tRNA, 600mM NaCl, 0.25% SDS, 1mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 10% Dextran sulfate가 함유된 용액에 후보유전자들의 cRNA 탐침자를 50°C에서 16시간 hybridization 하였다. Hybridization 후 1.5% Bloking Reagent(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)가 함유된 Dig buffer I(100mM Tris-HCl, 150mM NaCl)으로 세척하고 anti-Dig antibody를 Dig buffer I에 희석(1:88)하여 4°C에서 30분간 처리하였다. Dig buffer II (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 500mM MgCl₂)로 세척하고 nitroblue tetrazolium salt and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate(NBT/BCIP)로 발색하고 Dig buffer IV(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)로 3분간 세척한 다음 methyl green으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 실험 결과

1. Soft-diet군과 비교한 hard-diet-특이 유전자의 검출 및 homology 검색.

검출된 11종의 hard-diet군 특이 후보 유전자들 중에서 3종(FS-s1, FS-s22, FS-s26)은 그 기능이 알려져 있는 유전자들과 다른 5종(FS-s2, FS-s5, FS-s7, FS-s18, FS-s30)은 염기

서열은 보고되어 있으나 그 정확한 기능은 알려져 있지 않은 유전자들과 비교적 높은 homology를 나타냈다. 또 다른 3종의 유전자(FS-s31, FS-s35, FS-s38)들은 database에 보고된 유전자들과 homology를 나타내지 않는 미지의 유전자로 추정되었다(Table 1).

2. 육안 및 광학현미경적 관찰

Soft-diet군과 hard-diet군의 체중을 8주간의 식이조절 후 측정한 결과 soft-diet군에서는 40.7±3.8g hard-diet군에서는 43.8±4.9g으로 나타났다.

Soft-diet군과 hard-diet군의 하악골, 치아, 치주조직 및 하악과두를 hematoxylin-eosin 염색하여 관찰한 결과 두 군에서 다양한 형태학적 차이점이 관찰되었다. 치조골을 포함한 하악골의 골주의 양은 soft-diet군에 비하여 hard-diet군에서 현저히 증가된 소견을 보였으며 골외막과 골내막에서의 골모세포에 의한 신생골의 형성 또한 hard diet군에서 활발한 양상을 보였다(Fig. 1, 2). 또한, hard-diet군은 치조골의 치주인대에 인접한 면에서 상당수의 파골세포양 세포들과 반전선들이 관찰되었다. 하악과두에서 soft-diet군은 비대 연골층 하부에서 석회화된 비대연골의 뼈대 위에 넓은 골수강을 포함한 미성숙 상태의 신생골이 형성되고 있는 반면에 hard-diet군에서는 비대 연골층 하부에 좁아진 골수강을 포함한 성숙한 연골하골이 형성되어 있었고 일부에서는 파골세포양 세포들도 상당수 관찰되었다(Fig. 3, 4).

3. 후보 유전자들의 northern 분석

Homology 검색 결과 유전자의 기능이 알려져 있으며 기능력과 관련성이 적을 것으로 판단된 2종의 후보 유전자(FS-s1, FS-s26)는 northern 분석에서 제외하였다. 나머지 9개의 후보 유전자 단편들을 이용하여 northern 분석을 시행한 결과, FS-s31, FS-s38은 mRNA의 발현이 확인되지 않았으며 FS-s7,

Table 1. Summary of the cDNA clones isolated by subtractive hybridization between soft-diet and hard-diet group.

Clone ID	Insert length (bp)	Identity
FS-s1	450	Mus musculus Pcm1 gene
FS-s2	250	Mus musculus L1Md-Tf30 mRNA
FS-s5	700	Mus musculus clone RP23-247A1
FS-s7	206	Homo sapiens DC48 mRNA
FS-s18	1000	Mus musculus mRNA, 3' ends of unknown function protein
FS-s22	500	Mus musculus progesterone receptor mRNA
FS-s26	420	Mus musculus T-cell receptor alpha/delta locus
FS-s30	270	EST
FS-s31, 35, 38	260, 420, 540	Unknown

* FSs: functional force specific

FS-s30 및 FS-s35 유전자들은 mRNA의 발현은 확인되었으나 soft-diet군 hard-diet군에서 그 발현의 차이가 나타나지 않았다. 나머지 4종의 후보 유전자(FS-s2, FS-s5, FS-s18, FS-s22)들은 soft-diet군 hard-diet군에서 mRNA의 발현의 차이가 확인되었다. FS-s2와 FS-s5는 mRNA의 크기가 각각 3.8kb 및 2.5kb로 hard-diet군에서는 강하게 발현되나 soft-diet군에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 5A, 5B). FS-s18과 FS-s22는 mRNA의 크기가 각각 2.7kb 및 2.8kb로 hard-diet군에서 강하게 발현되나 soft-diet군에서도 약한 발현이 관찰되었다(Fig. 5C, 5D).

4. mRNA in-situ hybridization

FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 FS-s22 cRNA 탐침자를 이용한 in-situ hybridization에서 antisense 탐침자를 이용한 경우는 모두 각각의 mRNA 발현 소견을 보였으나 sense 탐침자들은 mRNA의 발현이 관찰되지 않았다.

FS-s2 mRNA는 soft-diet군에서는 치조골의 골모세포와 골세포, 치주인대세포 및 연골세포에서 미약한 발현을 나타냈으나 hard-diet군에서는 강한 발현을 보였다(Fig. 6, 7, 8). 그러나 치수내의 상아모세포와 치수내의 다른 세포들에서는 FS-s2 mRNA의 발현을 거의 확인 할 수 없었다. FS-s5 mRNA의 발현은 hard-diet군의 상아모세포, 치수세포, 연골, 하악과두 연골의 상부 즉 정지층과 증식층, 및 점액선에서 강하게 나타났으나 soft-diet군에서는 FS-s5 mRNA의 발현을 확인 할 수 없었다(Fig. 9, 10). FS-s18 mRNA는 hard-diet군에서는 치주인대세포, 법랑모세포, 상아모세포, 치수세포 및 연골세포에서 강한 발현을 나타냈으나 soft-diet군에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 11, 12). 치조골의 골모세포는 soft-diet군과 비교하여 hard-diet군에서 FS-s18 mRNA의 발현을 관찰 할 수 있었으나 그 발현 정도는 미약하였다(Fig. 17). FS-s22 mRNA의 발현은 hard-diet군의 치주인대세포와 골모세포에서 강하게 관찰되었고 치수세포에서는 약한 발현이 관찰되었으나, soft-diet군에서는 FS-s22 mRNA의 발현을 거의 확인 할 수 없었다(Fig. 14, 15).

IV. 총괄 및 고안

골의 형태가 변하는 것은 골 개조의 결과이며 이는 기계적 응력과 같은 물리적인 환경의 변화에서 기인한다⁴⁾. 최근에 Takano-Yamamoto 등²⁾은 골 개조 과정에서 골세포가 기계적 응력을 감지하는 세포라고 하였으며, Kostenuik 등¹⁸⁾은 기능력과 관계하여 parathyroid hormone과 insulin-like growth factor가 골모세포 전구세포의 전구세포의 활성을 매개한다고 하였다. 그러나 기능력의 작용에 의한 골 개조 과정 조절하는 분자생물학적 기전에 관하여는 현재까지 명확히 알려져 있지 않다.

기능력 저하를 유도하는 방법으로는 최근에 soft-diet과 hard diet를 응용한 방법이 널리 이용되고 있으나, 이 방법으로 기능력 저하를 유도하는 과정에서는 실험에 영향을 미칠 수 있는 여러 가지 인자들을 고려해야 한다^{19,20)}. 특히 단순 식이 조절과정에서 나타나는 전치부 교합에 의한 영향을 제거하는 것이 중요하다¹¹⁾. 본 실험에서는 이러한 이유로 생쥐 사육 기간동안 전치부의 교합이 이루어지지 않도록 주 2회씩 전치부를 삭제하였다. 또한, 성장한 생쥐를 교배하여 동시에 출생한 생쥐들을 각각 soft-diet군과 hard-diet군으로 나누어 이용하였고, 생쥐가 출생하여 약 23일이 지나 수유 시기가 끝 난 시점부터 어미와 분리하여 식이 방법을 달리 하였으며, 생쥐의 성장과 발육기간을 고려하여 8주 동안 사육을 시켰다. 또한 본 실험은 다른 실험들과 다르게 기능력 저하 상태에서 치아, 골 및 하악과두를 동시에 복합적으로 평가한 것도 특징적이라 할 수 있다.

Kostenuik 등¹⁸⁾은 실험적으로 기능력 저하 상태를 유도하면 골모세포의 수가 감소하고 골 체적이 줄어들며 석회화 과정이 저하된다고 하였으며, Watt와 Williams는 하악과두의 연골하골의 골주의 수가 줄어든다고 하였고, Hinton과 Carlson¹³⁾은 골주의 밀도와 알카리성 인산분해효소의 활성이 떨어지고 하악과두의 두께와 길이가 감소한다고 하였으며, Sasaguri 등²¹⁾은 soft-diet에 의한 기능력 저하 상태가 장골의 disuse atrophy 상태와 유사하나 일주일 정도 정상적으로 기능력을 다시 적용시키면 정상 소견으로 복귀 할 수 있다고 하였으며, 또 다른 많은 연구자들도 골 및 연골의 분화 등과 관련하여 이와 유사한 결과들을 보고하였다²²⁻²⁵⁾. 본 실험의 식이조절 후 형태학적 분석에서 치조골을 포함한 하악골의 골주의 양이 soft-diet군에 비하여 hard-diet군에서 현저히 증가된 소견을 보였으며 골외막과 골내막에서의 골모세포에의한 신생골의 형성 또한 hard diet군에서 활발한 양상을 보였고, 하악과두 연골은 soft-diet 군에서는 비대 연골층 하부에서 석회화된 비대연골의 뼈대 위에 넓은 골수강을 포함한 미성숙 상태의 신생골이 형성되고 있는 반면에 hard-diet군에서는 비대 연골층 하부에 좁아진 골수강을 포함한 성숙한 연골하골이 형성되었고, hard-diet군은 치조골의 치주인대에 인접한 면에서 상당수의 파골세포양 세포들과 반전선이 많이 관찰되는 등 활발한 골 개조 활동을 나타낸 결과는 다른 연구자들의 연구결과와 일치하였다^{20,26-28)}. 또한, soft-diet군의 하악과두에서 신생골의 형성이 계속된 반면 hard-diet군의 하악과두에서는 성숙한 형태의 골이 형성된 결과는 soft-diet가 연골성골화 과정을 hard-diet군보다 오랜 기간 유지시킨다는 즉 hard-diet군에서 골의 성숙이 더 빨리 진행된다는 Salo 등의 연구 결과와 일치한다^{29,30)}.

Takano-Yamamoto 등²⁾은 치아이동에 의한 기능력의 변화 과정에서 치조골과 치주인대에서 osteopontin, osteocalcin 및 osteonectin의 발현이 서로 다르게 나타난다고 하여 치주인대가 기능력 저하 상태에서 치조골과 다른 특성이 있음을 시사하였는데, 본 실험에서는 형태학적 관찰로 soft-diet과 hard-diet 치주인대의 특성의 차이는 관찰 할 수 없었으나, 인접 치조골의

골 개조 과정이 hard-diet군에서 두드러지게 나타남을 관찰하였고, FS-s2, FS-s5, FS-s18, FS-s22 등의 특이 유전자들은 in-situ hybridization 연구에서 soft-diet과 hard-diet군 사이에 서로 다른 양상으로 발현되는 것으로 보아 치주인대도 기능력 저하 상태에서 독특한 조직의 변화 나타내는 것으로 해석 할 수 있다.

본 실험에서 homology 검색 결과 유전자의 기능이 알려져 있으며 기능력과 관련성이 적을 것으로 판단된 2종의 후보 유전자(FS-s1, Fs-s26)를 제외하고, 나머지 9개의 후보 유전자 단편들을 이용하여 northern 분석을 시행한 결과 두 개의 유전자(FS-s31, FS-s38)는 mRNA의 발현이 확인되지 않았으며 세 개의 유전자 단편(FS-s7, FS-s30, FS-s35) 유전자들은 mRNA의 발현은 확인되었으나 soft-diet군 hard-diet군에서 그 발현의 차이가 나타나지 않았는데, 이는 생체내에서 유전자들의 발현이 미미한 결과이거나 subtraction 과정의 비특이적 산물의 검출 결과로 생각된다.

Soft-diet군에 비하여 hard-diet군에서 선택적으로 발현되는 후보 유전자로 FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22가 검출되었는데 FS-s2, FS-s5와 FS-s18는 Genebank에 유전자의 서열들이 일부 혹은 전체적으로 보고되어 있었으나, 그 기능에 관하여는 보고된 내용이 없는 새로운 유전자로 확인되었다. 특히 FS-s18은 기능 알려져 있지 않는 단백질을 code화하고 있는 유전자로 기능력과 관계하여 그 역할을 가장 먼저 규명해야 할 것으로 생각된다. 또한, FS-s22 유전자는 homology 검색에서 progesterone receptor와 동일한 유전자로 확인되었다. Progesterone receptor와 관련하여, Villareal 등³¹⁾은 골다공증 환자에게 estrogen과 progesterone 복합체를 투여하면 골다공증 감소 효과가 나타나며, Rabiee 등³²⁾은 난관 절제술을 시행하여 골다공증과 유사한 조건을 만들면 progesterone도 생체에서 거의 찾아 볼 수 없다고 하였으며, Braun과 Horton³³⁾은 여성에서 운동을 하면 근육에서 글루코스 대사 경로가 억제되고 estrogen과 progesterone에 의한 지방대사 경로가 촉진된다고 하는 등의 progesterone과 골 및 운동과의 연관성을 시사하는 연구 결과를 보고하였다^{34,35)}. 다른 연구에서 progesterone과 기능력과의 관련성을 밝힌 결과는 없었으나 본 실험에서 hard-diet군에서 progesterone receptor 유전자와 동일한 FS-s22 유전자가 특이하게 발현되는 것으로 보아 FS-22도 기능력의 변화과정에 중요한 역할을 하는 유전자로 생각할 수 있다.

In-situ hybridization 실험에서 FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22 유전자가 기능력이 작용하는 hard-diet군의 골모세포, 법랑모세포, 상아모세포, 치주인대, 치수세포 및 연골세포 등에 종류에 따라서 약간씩 서로 다른 분포 양상을 보였는데, 이는 4종의 유전자가 기능력과 관계하여 서로 다른 기능을 힘을 암시하는 결과이다. 또한, 4종의 유전자가 모두 hard-diet군의 골모세포와 치주인대에서 선택적으로 발현되는 것으로 보아 골과 치주인대가 기능력에 따라 변화를 특징적으로 나타내는 조직으

로 생각 할 수 있다.

본 실험에서 실험적으로 기능력의 저하 상태를 유도하여 이를 형태학적으로 확인하고 이 결과를 토대로 정상 기능력 적용 생쥐의 하악골과 하악과두 연골에서 특이하게 발현되는 4개의 유전자(FS-s2, FS-s5, FS-s18, Fs-s22)들을 검출하고 그 유전자의 조직내 분포를 확인하였다. 결론적으로 FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22 유전자들이 기능력과 연관하여 중요한 역할을 하는 것들로 추정되나, 이를 명확히 하기 위해서는 앞으로 4개의 유전자들의 단백질의 구조와 발현 및 다른 인자들과의 상호 작용에 관한 보완 연구 등이 필요할 것으로 사료되며, 그 연구 결과를 통하여 기능력과 관련한 분자생물학적 기전을 이해하는데 기여할 수 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 ICR 생쥐를 8주 동안 soft-diet과 hard-diet의 식이 조절을 통해 기능력의 변화를 유도하여, 기능력의 변화와 관련한 특이 유전자를 검출하기 위하여 subtractive hybridization, northern 분석 및 mRNA in-situ hybridization 등의 실험을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Soft-diet군과 hard-diet군의 subtractive hybridization을 통하여 총 39개의 clone을 얻었고 이중에서 11개의 서로 다른 hard-diet군 특이 후보 유전자들을 분리하였다.
2. 11개의 후보유전자들 중에서 homology 검색과 northern 분석을 통하여 기능력과 관련이 있을 것으로 생각되거나 hard-diet군에서 mRNA가 선택적으로 발현되는 FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22 유전자를 선택하였다.
3. FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22 유전자의 cRNA 탐침자를 이용한 in-situ hybridization에서 4개의 유전자의 mRNA들은 hard-diet군의 세포들에서는 강하게 발현되었으나 soft-diet군의 세포들에서는 그 발현이 미약하거나 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 FS-s2, FS-s5, FS-s18 및 Fs-s22 유전자는 대부분이 기능이 거의 알려져 있지 않는 것들로 기능력의 변화 과정에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되나 앞으로 보완 연구를 통하여 각각의 유전자들의 보다 정확한 기능을 이해하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Liu ZJ, Herring SW : Masticatory strains on osseous and ligamentous components of the temporomandibular joint in miniature pigs. J Orofac Pain, 14:265-278, 2000.
2. Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, et al. : Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, Osteocalcin, and osteopontin revealed by

- in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem and cytochem*, 42:885-896, 1994.
3. Tuominen M, Kantomaa T, Pirttiniemi P, et al. : Growth and type-II collagen expression in the glenoid fossa of the temporomandibular joint during altered loading: a study in the rat. *Eur J Orthod*, 18:3-9, 1996.
 4. Nomura S, Takano-Yamamoto T : Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol*, 19:91-96, 2000.
 5. Pedersen EA, Akhter MP, Cullen DM, et al. : Bone response to in vivo mechanical loading in C3H/HeJ mice. *Calcif Tissue Int*, 65:41-46, 1999.
 6. Sato M, Ochi T, Nakase T, et al. : Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein(BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone and Mineral Res*, 14:1084-1095, 1999.
 7. Yasui N, Sato M, Ochi T, et al. : Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg*, 79-B:824-830, 1997.
 8. Glineburg RW, Laskin DM, Blaustein DI : The effects of immobilization on the primate temporomandibular joint:a histologic and histochemical study. *J Oral Maxillofac Surg*, 40:3-8, 1982.
 9. Ghafari J, Cowin DH : Condylar cartilage in the muscular dystrophic mouse. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 107:114, 1989.
 10. Leonardi R, Villari L, Bernasconi G, et al. : Cellular S-100 protein immunostaining in human dysfunctional temporomandibular joint discs. *Arch oral Biol*, 45:411-418, 2000.
 11. Smith DM, McLachlan KR, McCall WD : A numerical model of temporomandibular joint loading. *J Dent Res*, 65:1046-1052, 1986.
 12. Shaw RM, Molyneux GS : The effects of mandibular hypofunction on the development of the mandibular disc in the rabbit. *Archs Oral Biol*, 39:747-752, 1994.
 13. Hinton RJ : Effect of dietary consistency on matrix synthesis and composition in the rat condylar cartilage. *Acta Anat*, 147:97-104, 1993.
 14. Tsolakis AI, Spyropoulos MN, Datsavrias E, et al. : Effects of altered mandibular function on mandibular growth after condylectomy. *Eur J Orthod*, 19:9-19, 1997.
 15. Luder HU, Leblond CP, von der Mark K : Celluar stages in cartilage formation as revealed by morphometry, radioautography and type II collagen immunostaining of the mandibular condyle form weanling rats. *Am J Anat*, 182:197-214, 1988.
 16. Deleersnijder W, Hong G, Cortvriendt R, et al. : Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. *J Biol Chem*, 271:19475-19482, 1996.
 17. Park JC, Kim YB, Kim HJ, et al. : Isolation and Characterization of Cultured Human Periodontal Ligament Fibroblast-Specific cDNAs. *Biochem Biophy Res Comm*, 282:1145-1153, 2001.
 18. Kostenuik PJ, Harris J, Halloran BP, et al. : Skeletal unloading cause resistance of osteoprogenitor cells to parathyroid hormone and to insulin-like growth factor-I. *J Bone and Mineral Res*, 14:21-31.
 19. Hinton RJ, Carlson DS : Response of the mandibular joint to loss of incisal function in the rat. *Acta anat*, 125:145-151, 1986.
 20. Yamada K, Kimmel DB : The effect of dietary consistency on bone mass and turnover in the growing rat mandible. *Archs Oral Biol*, 36:129-138, 1991.
 21. Sasaguri K, Jiang H, Chen J : The effect of altered functional forces on the expression of bone-matrix proteins in developing mouse mandibular condyl. *Archs Oral Biol*, 43:83-92, 1998.
 22. Ali AM, Sharawy M : An immunohistochemical study of the effects of surgical induction of anterior disc displacement in the rabbit craniomandibular joint on type I and type I collagens. *Archs Oral Biol*, 40:473-480, 1995.
 23. Ali AM, Sharawy M : Enlargement of the rabbit mandibular condyle after experimental induction anterior disc displacement. *J Oral Maxillofac Surg*, 53:544-460, 1995.
 24. Ali AM, Sharawy MM : An immunohistochemical study of collagen types III, VI and IX in rabbit craniomandibular joint tissues following surgical induction of anterior disc displacement. *J Oral Pathol Med*, 25:78-85, 1996.
 25. Ali AM, Sharawy M, O'Dell NL, et al. : Morphological alterations in the elastic fibers of the rabbit craniomandibular joint following experimentally induced anterior disk displacement. *Acta Anat*, 147:159-167, 1993.
 26. Pitsillides AA, Rawlinson SCF, Suswillo RFL, et al.

- : Mechanical strain-induced NO production by bone cells:a possible role in adaptive bone (re)modeling?. FASEB J, 9:1614-1622, 1995.
27. Rashed MZ, Sharawy MM : Histopathological and immunocytochemical studies of the effect of raised occlusal vertical dimension on the condylar cartilage of the rabbit. Cranio, 11:291-296, 1993.
28. Rittling SR, Matsunoto HN, McKee MD, et al. : Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. J Bone and Mineral Res, 13:1101-1111, 1998.
29. Salo LA, Hoyland J, Ayad S, et al. : The expression of type X and VI collagen and fibrillin in rat mandibular condylar cartilage. Acta Odontol Scand, 54:295-302, 1996.
30. Salo LA, Hoyland J, Ayad S, et al. : The expression of types X and VI collagen and fibrillin in rat mandibular condylar cartilage. Response to mastication forces. Acta Odontol Scand, 54:295-302, 1996.
31. Villareal DT, Binder EF, Williams DB, et al. : Bone mineral density response to estrogen replacement in frail elderly women: a randomized control trial. JAMA, 286:815-20, 2001.
32. Rabiee A, Macmillan K, Schwarzenberger F, et al. : Suppression of ovarian progesterone production in dairy cows using an implant of GnRH-agonist (deslorelin) for the purpose of evaluating. Aust Vet J, 79:690-4, 2001.
33. Braun B, Horton T : Endocrine regulation of exercise substrate utilization in women compared men. Exerc Sport Sci Rev, 29:149-154, 2001.
34. Ringe JD : Senile osteoporosis-prevention and therapy. Z Gerontol, 26:34-8, 1993.
35. Wezeman, FH, Gong Z : Bone Marrow triglyceride accumulation and hormonal changes during long-term alcohol intake in male and female rats. Alcohol Clin Exp Res, 25:1515-22, 2001.

Reprint requests to:

Chang-Seop Lee

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Chosun University
421, Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju, 501-759, Korea
E-mail : Csalee@chosun.ac.kr

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1. Photomicrograph of mandibular bone in a mouse fed a soft-diet for 8 weeks. alv, alveolar bone. Hematoxylin and eosin stain. $\times 100$.
- Fig. 2. Photomicrograph of mandibular bone in a mouse fed a hard-diet for 8 weeks. There are many reversal lines (arrows) and osteoclasts (open arrow), which indicating that the rate of bone remodeling is very active. Active osteoblastic activity is also observed along the bone trabeculae. Hematoxylin and eosin stain. $\times 100$.
- Fig. 3. Photomicrograph of mandibular condyle in a mouse fed a soft-diet for 8 weeks. Remnants of calcified cartilage (arrows) matrix appear covered by eosinophilic primary bone tissue (open arrows). Calcified cartilage has no cells, whereas bone matrix contains some osteocytes. Hematoxylin and eosin stain. $\times 100$.
- Fig. 4. Photomicrograph of mandibular condyle in a mouse fed a hard-diet for 8 weeks. Arrows indicate well formed mature subchondral bone under the hypertrophic chondrocyte layer of mandibular condyle. Hematoxylin and eosin stain. $\times 100$.
- Fig. 5. Northern blot analysis of FS-s2(A), FS-s5(B), FS-s18(C), and FS-s22(D) mRNA expression in both soft-diet and hard-diet group. The total RNA was extracted from mouse mandible. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) was used as the control. HD, hard-diet; SD, soft-diet.
- Fig. 6. Expression of mRNA for FS-s2 in tooth of a mouse fed a soft-diet for 8 weeks. A few cells show a lower level of FS-s2 expression in the periodontal ligament. The section was counter-stained with methyl green. $\times 40$.
- Fig. 7. Expression of mRNA for FS-s2 in mandibular bone of a mouse fed a soft-diet for 8 weeks. The weak positive signals are seen in the osteoblasts lining the bone surface. The section was counter-stained with methyl green. $\times 40$.
- Fig. 8. Expression of mRNA for FS-s2 in tooth of a mouse fed a hard-diet for 8 weeks. FS-s2 mRNA expression are observed in the periodontal ligament but not in the tooth pulp. p, tooth pulp; d, dentin; alv, alveolar bone. The section was counter-stained with methyl green. $\times 100$.
- Fig. 9. Expression of mRNA for FS-s5 in tooth of a mouse fed a soft-diet for 8 weeks. The section was counter-stained with methyl green. $\times 100$.
- Fig. 10. Expression of mRNA for FS-s5 in tooth of a mouse fed a hard-diet for 8 weeks. FS-s5 shows high levels of mRNA expression in the cells of periodontal ligament and tooth pulp. p, tooth pulp; d, dentin; alv, alveolar bone. The section was counter-stained with methyl green. $\times 200$.
- Fig. 11. Expression of mRNA for FS-s18 in mandibular bone of a mouse fed a soft-diet for 8 weeks. Low levels of FS-s18 mRNA expression are detected in the osteoblasts. The section was counter-stained with methyl green. $\times 40$.
- Fig. 12. Expression of mRNA for FS-s18 in mandibular bone of a mouse fed a soft-diet for 8 weeks. The strong positive signals are observed in the osteoblasts lining the bone surface. The section was counter-stained with methyl green. $\times 40$.
- Fig. 13. Expression of mRNA for FS-s18 in tooth of a mouse fed a hard-diet for 8 weeks. The section was counter-stained with methyl green. $\times 100$.
- Fig. 14. Expression of mRNA for FS-s22 in tooth of a mouse fed a soft-diet for 8 weeks. There are no FS-s22 transcripts expression in tooth and periontium. The section was counter-stained with methyl green. $\times 100$.
- Fig. 15. Expression of mRNA for FS-s22 in tooth of a mouse fed a hard-diet for 8 weeks. FS-s22 transcripts are strongly expressed in the pulp tissue and particularly in periodontal ligament cells. The section was counter-stained with methyl green. $\times 100$.

사진부도 ①



Fig. 1

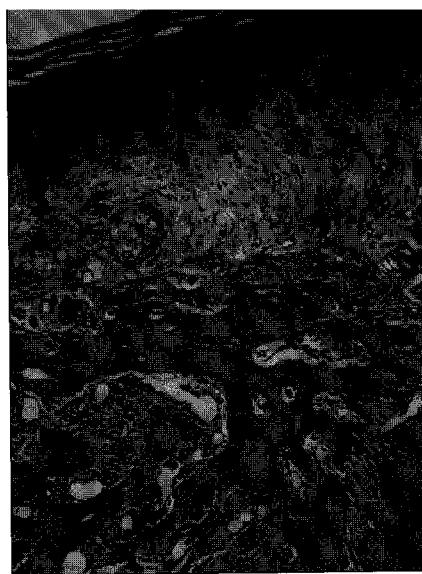


Fig. 2

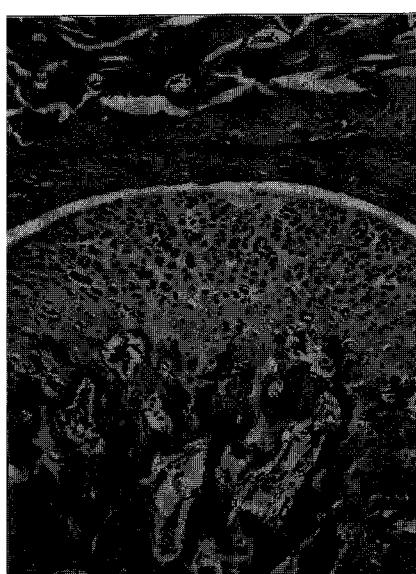


Fig. 3

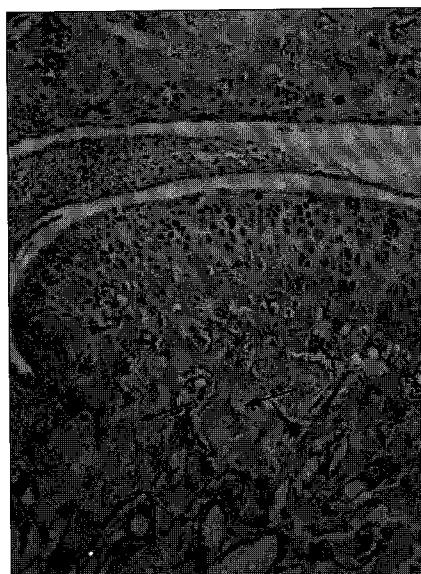


Fig. 4

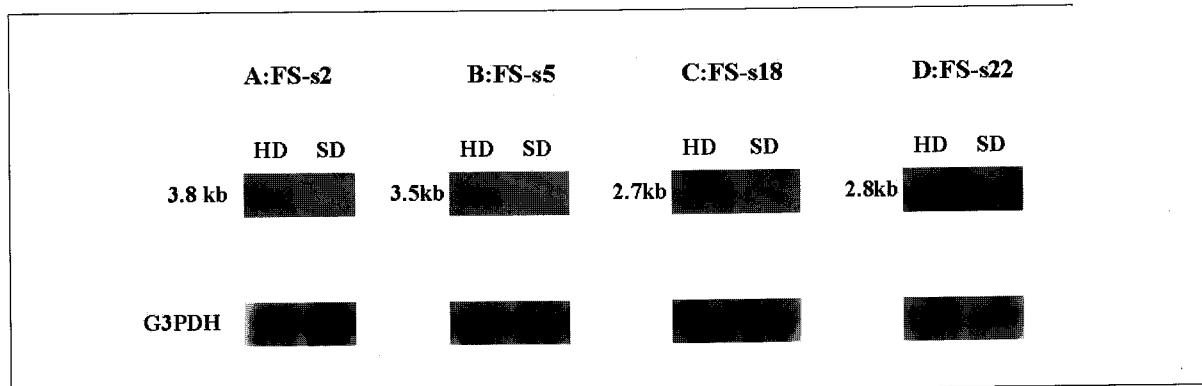


Fig. 5

사진부도 ②



Fig. 6



Fig. 8

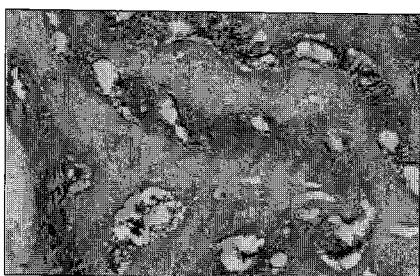


Fig. 7



Fig. 9



Fig. 10

사진부도 ③

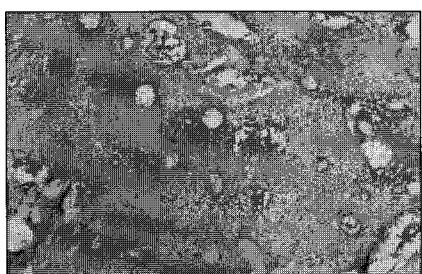


Fig. 11



Fig. 13



Fig. 14



Fig. 15

Abstract

THE EFFECT OF ALTERED FUNCTIONAL FORCE ON THE EXPRESSION OF SPECIFIC MRNAS IN THE DEVELOPING MOUSE MANDIBLE

Hyung-Tae Kim, Joo-Cheol Park*, Chang-Seop Lee,
Heon-Dong Park

Department of Pediatric Dentistry and department of Oral Histology,
College of Dentistry, Oral Research Institute of Chosun University*

Mechanical forces are known to have an effect on bone formation, maintenance and remodeling, and there is evidence that the development of the mandibular condyle in the rat or mouse is influenced by altered functional force. However, studies are lacking in molecular-biologic mechanism such as the identification of differentiation factor induced from functional force. Here a mouse model was used to investigate the functional stress-responsive gene or factors which is related to the altered force by comparing the expression genes of functional state and hypo-functional state of the mouse mandible.

ICR mice were provisioned with either a soft, mushy diet (soft-diet group) or hard rat pellets (hard-diet group) beginning at weaning for the alteration of functional force and subsequently sacrificed at 89 days of age. Incisor of mice in group 1 were trimmed twice a week to reduce occlusal forces. After killing the animals, mandibular bone including condyle were collected for RNA extraction, subtractive hybridization, northern blot analysis and mRNA in-situ hybridization.

The results as follows:

1. A total of 39 clones were sequenced, and 11 individual sequence types were subsequently identified by subtractive hybridization, as 28 clones were represented twice in the analyzed sets.
2. Consequently four candidate clones, FS-s (functional stress-specific)2, -5, -18, and -22 were identified and characterized by homology search and northern analysis. Four of these clones, FS-s2, -5, -18, and -22, were shown to be expressed differentially in the hard-diet group.
3. Histologic sections showed that osteoblastic activity along the bone trabeculae and active bone remodeling were significantly lower in soft than in hard diet animals. A soft diet seems to enable a longer period of endochondral ossification in the mandibular condyle.
4. Although the mRNAs of FS-s2, -5, -18, and -22 were expressed rarely by cells of the soft-diet group, highest expression was detected in the cells of the hard-diet group.

Together with the above results, it is suggested that FS-s2, -5, -18, and -22 could act as an important factors controlling the tissue changes in response to functional stress. The exact functional significance of these findings remains to be established.

Key words : Soft-diet, Hard-diet, Functional force, Specific mRNA, Mandible