

치주인대, 이틀뼈 및 시멘트질의 발생 과정에서 치주인대 -특이 유전자 PDLs22의 발현

지 숙¹, 김병욱¹, 김홍중², 김성미, 박주철*

¹조선대학교 치과대학 치주과학교실, ²구강해부학교실, 구강조직학교실

〈 초 록 〉

치주인대 (periodontal ligament)는 치아를 지지할 뿐만 아니라 인접 이틀뼈 및 시멘트질의 수복과 재생에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 치주인대 세포의 발생과 분화에 선택적으로 관여하는 유전자에 대한 연구는 미미한 실정이다. 치주인대 세포의 분화와 뼈와 시멘트질의 형성과정에서 치주인대-특이 유전자인 PDLs22의 명확한 기능을 알아보기 위하여 배양 치주인대 세포의 분화 과정에서 PDLs22, osteonectin과 osteocalcin mRNA 발현을 RT-PCR법으로 비교하였고, PDLs22에 대한 항체를 제작한 후 흰쥐 치아와 치주조직 발생과정에서 PDLs22 단백질의 분포를 면역조직화학적으로 확인하였다. 치주인대 세포들은 배양 14일째에 석회화 결절을 형성하였고, 세포의 배양과정에서 osteocalcin mRNA는 배양 초기부터 발현되어 배양 기간 동안에 강하게 발현되었으며, osteonectin PDLs22 mRNA는 배양 초기부터 발현되었으나 석회화 결절이 형성되면서 발현이 감소되었다. 면역조직화학적 염색소견에서 PDLs22 단백질은 치아관 형성시기의 바깥치아상피와 별그물에서 발현되기 시작하여 HERS (Hertwig's epithelial root sheath)의 바깥치아상피로 이어진 다음 치주인대, 이틀뼈 및 시멘트질을 형성하기 위한 전구세포에서 강하게 발현되었다. 이상의 결과를 종합하면 치주인대-특이 유전자 PDLs22는 치주조직 발생에 있어 상피-간엽간의 중요한 매개물질로 작용하며, 뼈와 시멘트질의 초기 형성과정에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 치주인대, PDLs22, 특이 유전자, 이틀뼈, 시멘트질

서 론

치주인대 (periodontal ligament)는 두 개의 석회화 조직인 뼈와 시멘트질 (cementum) 사이에 위치하는 치밀결합조직으로 치아를 유지시켜주고 경조직의 구조적 특성을 유지시키는데 중요한 기능을 할 뿐만 아니라 생체 내에서의 인접 이틀뼈 (alveolar bone) 및 시멘트질의 수복과 재생에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (McCulloch, 1993). 치주인대 세포는 동종의 세포들만으로 구성된 것이 아니라 표현형과 기능이 상이한 여러 아개체 (subpopulation)의 세포로 이루어져 있는데 일부 세포는 높은 알칼리성 인산분해효소 활성, 부갑상선 호르몬에 대한 반응성, 뼈유사 기질 폴리펩타이드의 생산 및 석회화 결절의 형성과 같은 뼈와 시멘트질을 형성하는 세포의 전구세포의 특징을 보인다 (Kawase *et al.*, 1990; McCulloch

& Bordin, 1991; Cho *et al.*, 1992; Goseki *et al.*, 1996).

치주인대세포는 잇몸 (gingiva)의 상피세포나 잇몸 결합조직의 세포보다 양호한 치유양상을 나타낸다고 보고되고 있고 (Melcher, 1970; Gottlow *et al.*, 1997), Nyman *et al.* (1982)은 뼈 결손 부위에 상피세포와 잇몸 결합조직에서 유래되는 세포의 침투를 막고 치주인대 세포만의 증식을 허용하는 방법으로 차단막을 이용한 조직유도 재생술을 통하여 결합조직의 부작과 함께 신생 시멘트질의 형성을 관찰하였다. 또한 치주인대세포에 ascorbic acid, β -glycerophosphate, dexamethasone를 첨가한 조건배지에서 뼈나 시멘트질과 유사한 석회화 결절이 형성되었다는 여러 실험결과가 보고되고 있다 (Nilda *et al.*, 1991). 위의 결과들은 치주인대 내에 뼈나 시멘트질을 형성할 수 있는 시멘트질모세포나 뼈모세포의 전구세포가 존재하여 특수한 환경에서 뼈나 시멘트질을 형성하는 세포로 분화가 가능하다는 것을 의미한다.

뼈와 시멘트질 형성에 있어 치주인대 세포의 분화와 관련된 인자들로 PDGF (platelet-derived growth factor, Howes *et al.*, 1988), TGF- β 1 (transforming growth factor- β , Dennison *et*

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.(02-PJ1-PG3-20507-0001)

* 교신저자: 박주철

Tel: 062-230-6874, Fax: 062-224-3706; jcpark@chosun.ac.kr

al., 1994), FGF (fibroblast growth factors, Canalis *et al.*, 1988), EGF (epidermal growth factors, Cho *et al.*, 1991), PTH-RP (parathyroid hormone-related protein, Nohutcu *et al.*, 1995)와 BMP (bone morphogenetic proteins, Reddi & Cunningham, 1993)가 유력하게 제시되고 있으나 이들은 경조직의 형성에 전반적으로 관여하는 인자들로 생각할 수 있으며 치주인대 세포의 분화에 선택적으로 관여한다고는 볼 수 없다.

최근에 뼈모세포 특이 단백질인 Osterix가 뼈모세포의 분화와 뼈 형성을 조절하는 인자라는 Nakashima *et al.* (2002)의 연구결과에서도 알 수 있듯이, 각각의 세포의 분화를 조절하는 인자는 세포-특이 유전자와 깊은 관련을 갖는 경우가 대부분이다. 치주인대에 존재하는 세포들에서 특징적으로 발현되는 유전자들로 Duarte *et al.* (1998, 1999)은 S100 칼슘결합 단백질계 (S100 calcium-binding protein family)의 일종인 S100A4와 S100A2 칼슘결합단백을 보고하였고, Horiuchi *et al.* (1999)은 뼈모세포-특이 인자 (osteoblast-specific factor)로 알려진 페리오스틴 (periostin)을 보고하였다. S100A4와 S100A2는 소의 치주조직에서 분리되었는데, 그 중 S100A2는 치주인대 뿐만 아니라 잇몸에서도 존재하는 것으로 밝혀져 치주인대의 발생과 분화와 관련하여 치주인대에서 특이적인 기능을 기대할 수 없게 되었고, S100A4는 잇몸에 비하여 치주인대에서 선택적으로 발현되거나 배양뼈속질세포나 치주인대세포에 S100A4를 투여하면 석회화 소결절의 형성이 억제되는 것으로 알려져 있다 (Duarte *et al.*, 1999). 따라서 S100A4는 치주인대 섬유모세포의 초기 발생이나 분화에 관여하기보다는 치주인대 형성 후에 치주인대의 석회화를 방해하여 치주인대의 폭경을 유지하는 것으로 생각되고 있다. 한편, 뼈모세포주인 MC3T3E1 세포주에서 뼈모세포에 특이한 인자로 최초 분리된 페리오스틴은 뼈막과 치주인대에 조직 특이적으로 발현되며 그 발현이 TGF- β 에 의해 조절된다고 알려져 있으나 (Johnson & Lancero, 1999), 뼈막에서는 뼈형성 초기에 뼈모세포를 모여들게 하고 부착하는 데 관여하며 치주인대에서도 치주인대에 존재하는 뼈모세포들의 발생과 분화과정에 관여하는 것으로 생각할 수 있다. 결국 현재까지 치주인대 섬유모세포의 분화나 발생에 선택적으로 관여하는 유전자에 관한 연구는 미미한 실정이다.

최근에 Park *et al.* (2001)은 치주조직의 재생을 유도할 수 있는 분화유도인자에 관한 연구에서 일반 결합조직의 섬유모세포인 잇몸 섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포에서 선택적으로 발현되는 유전자가 치주인대의 발생과 분화에 중요한 역할을 할 수 있다는 논리를 바탕으로 배양 잇몸 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포 사이의 유전자들을 subtraction 방법으로 비교하여 치주인대 섬유모세포-특이 유전자; PDLs5, 17, 22, 25, 31을 검출하였다. 그 중에서도 PDLs22는 노던분석, mRNA *in-situ* hybridization 등의 연구에서 다른 조직에 비하여 치주인대에서 선택적으로 발현되는

것으로 보고하여 치주인대 세포의 분화와 재생과정에서 그 역할의 가능성을 시사하였다.

본 연구의 목적은 치주인대, 이틀뼈 및 시멘트질의 형성과정에서 PDLs22의 발현을 확인하여 이들의 형성과정을 조절하는 분화 유도 인자를 탐색하기 위함이다. 치주인대 세포의 분화와 뼈와 시멘트질의 석회화 과정에서 PDLs22의 발현 변화를 연구하기 위하여, 치주인대 섬유모세포를 14일간 배양하여 석회화 단계까지 분화를 유도한 후 각각의 단계에서 PDLs22와 일반적으로 뼈에서 발현되는 유전자들인 ON (osteonectin)과 OC (osteocalcin) mRNA 발현을 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 방법으로 비교하였다. 또한 치아와 치주조직 발생과정에서 PDLs22 단백질의 분포를 확인하기 위하여 PDLs22에 대한 항체를 제작하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 배양 치주인대 섬유모세포의 PDLs22 발현 분석

교정 치료를 목적으로 발거된 20대 환자의 위아래턱뼈 작은어금니의 치주인대 조직을 무균상태에서 항생제가 함유된 Hank's Balanced Salt Solution (Gibco BRL, Rockville, USA) 용액으로 수회 세척한 후 해부현미경하에서 1~2 mm³ 정도의 크기로 자른 다음, 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Rockville, USA) 및 항생제 (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml, gentamycin 50 μ g/ml와 fungizone 2.5 μ g/ml 등)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, USA)을 이용하여 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 상태의 세포 배양기에서 일차 배양하였다. 일차 배양된 세포들을 계대 배양하여 3계대의 세포를 실험에 이용하였다.

1) 석회화 결절의 형성 확인

3계대의 세포들을 ascorbic acid (50 μ g/ml)와 β -glycerophosphate (10 mM) 및 Dexamethasone (5 μ M)을 함유한 DMEM 배양액을 투여하면서 14일간 배양하였다. 배양 14일 후 PBS로 세 번 세척하고 70% ethanol로 20분간 고정한 다음 0.1% NH₄OH가 함유된 1% Alizalin Red-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 용액으로 5분간 염색하였다.

2) RT-PCR 분석

3계대의 세포들을 ascorbic acid (50 μ g/ml)와 β -glycerophosphate (10 mM) 및 Dexamethasone (5 μ M)을 투여하면서 14일간 배양하였다. 배양 0일, 4일, 7일 그리고 14일 후 Trizol reagents (Gibco BRL, Rockville, USA)를 이용하여 각각의 세포에서 total RNA를 추출하였다. 각각의 RNA들을 역전사 효소 (Reverse Transcriptase of Avian Myeloblastosis Virus, Life Sciences, USA) 15U를 사용하여 first strand cDNA를 합성하였

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) primer sets

Protein	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Tm (°C)
OC	S 19-39 ATGAGAGCCTCACACTCCTC	303	66
	AS 321-301 CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG		
ON	S 1240-1255 ACATGGGTGGACACGG	405	52
	AS1644-1627 CCAACAGCCTAATGTGAA		
PDLs22	S 171-190 GCAAGACACACAGCCGAGC	761	54
	AS 831-814 CCAGTGCCAGGAAAGC		
G3PDH	S 386-402 CCATGGAGAAGGCTGGG	195	55
	AS 580-561 CAAAGTTGTCATGGATGACC		

OC, osteocalcin; ON, osteonectin; PDLs22, PDL specific 22; G3PDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

다. First strand와 PDLs22, ON, OC, G3PDH 특이적 Primer (Table 1)를 이용하여 PCR (Polymerase chain reaction) 증폭을 시행하였다.

PCR 조건은 95°C에서 1분, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분 간의 사이클을 30회 실시하였다. PCR 생성물을 2.0% 아가로스겔에서 전기영동하여 유전자들의 발현을 확인하였다. 분리된 유전자 단편들을 pGEM-Teasy Vector System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 subcloning하고 자동 염기서열 분석기 (ABI 310, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열을 분석한 후 Blast search program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 이용하여 ON, OC, G3PDH 유전자로 보고된 염기서열과 동일한지 확인하였다.

2. 면역조직화학적 염색

1) 조직 표본제작

태생 16일, 출생 7일, 14일, 21일의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 각각 5마리씩 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정시킨 후 상, 아래턱뼈를 적출하여 4°C의 4% paraformaldehyde 용액에서 16시간 재고정하였다. Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액으로 2시간 세척하고, 10% EDTA 용액에서 2~4주간 탈회하고, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV ethanol로 각각 12시간씩 탈수하였다. Chloroform 용액에서 2시간씩 4회 처리한 후 통법에 따라 paraffin에 포매하고 5 µm 두께로 박절한 후, ethoxy-silran-coated 슬라이드에 붙여 4°C에서 보관하여 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

2) PDLs22 단백질에 대한 항체의 제작

사람 PDLs22의 폴리펩타이드 영역에서 펩타이드 ISNKY-LVKRQSRD를 선택, 주문 합성하였다. 펩타이드들은 자동 펩타이드 합성기 (모델 430; Applied Biosystems, USA)의 보조 하에 고상 절차를 사용하여 화학적으로 합성하였다. 합성 펩타이드를 MBS 커플링 방법에 의해 실프리드릴기를 통해 담체 폴리펩타이드인 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)에 접

합시켰다. 1 ml의 완전 프로인트 보조제 (complete Freund's adjuvant)를 이용하여 KLH에 접합시킨 합성 펩타이드 항원 용액 (100 µg/ml)을 안정하게 부유화시킨 후 토끼 림프 결절에 주입하여 1차 면역시켰다. 3주 후 100 µg/ml의 항원으로 2차 면역 후, 다시 10일 후 50 µg/ml의 항원 용액으로 3차 면역시켰다. 10일 후 귀의 이면 중추 동맥에서 채혈하여 얻은 다클론 항혈청을 CNBr-sepharose 4B (Amersham pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 친화성 정제 (Pepton, Korea)하였다.

3) 면역조직화학적 염색

절편을 xylene으로 탈 파라핀 처리하고 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올의 순서로 함수 후, 0.1 M PBS로 두 차례 세척하고, 0.3% 과산화수소를 포함한 메탄올 용액에서 20~30분 동안 endogenous peroxidase block 처리한 후 다시 PBS로 세 차례 세척하였다. 이 절편을 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin)가 함유된 PBS 용액을 사용하여 희석된 normal serum으로 20분 동안 처리한 뒤, PBS로 세척하였다. 절편을 1차 항체로서 normal serum을 사용하여 1:10의 비율로 희석한 PDLs22 항혈청과 4°C에서 하루 밤 동안 처리하였다. PBS로 40분 동안 세척한 후, 절편을 2차 항체로서 PBS에 1:200의 비율로 희석한 염소 항토끼 IgG항체 (Vector Lab, USA)와 실온에서 1시간 동안 처리하였다. PBS로 20분 동안 세척한 후, 절편을 사용하기 30분전에 PBS로 희석한 ABC 시약 (Vector Lab, USA)과 45분 동안 반응시켰다. PBS로 20분 동안 세척한 후 0.05% DAB (Diaminobenzidine Tetrahydrochloride)를 이용한 비색반응으로 발색시킨 후, 절편을 세척하고 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 배양 사람 치주인대 세포에서 PDLs22의 발현 분석

1) 세포 배양 및 석회화 결절의 형성

배양 치주인대 세포들은 ascorbic acid, β-glycerophosphate 및 Dexamethasone 첨가 후 배양 4일에는 방추형의 형태를 나타내다가 배양 7일에는 세포가 층을 이루면서 증식되었고 배양 14일경부터 여러 층으로 된 세포 집합체를 형성하였고 집합체의 중심에서부터 석회화가 진행되었다. 배양 14일부터 관찰되는 세포 집합체의 석회화 결절 형성 여부를 관찰하기 위하여 Alizarin-Red S로 염색한 결과 대부분의 세포 집합체들은 석회화 결절을 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있으며, 결절 중앙 부위가 진하게 농염되고 주위로 연하게 염색되는 양상을 보였다 (Fig. 1).

2) RT-PCR 분석

사람 치주인대 세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한

14일의 배양 과정에서 OC mRNA는 배양 시작부터 치주인대 세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일과 석회화 결절이 형성되기 시작하는 14일까지 동일한 발현 양상이 유지되었다. 한편 ON mRNA는 배양 시작 후 4일, 7일까지 발현이 유지되다가 석회화 결절이 형성되는 14일에는 발현이 다소 감소하는 소견을 보였다. PDLs22 mRNA는 ON과 유사한 형태로 배양 시작부터 치주인대 세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일까지 발현이 유지되다가 석회화 결절의 형성이 시작되는 시점인 14일에서는 발현이 다소 감소된 소견을 보였다(Fig. 2).

2. 면역조직화학적 염색 소견

흰쥐 아래턱뼈 첫째어금니의 모자상기인 16일 배자의 조직표본에서 PDLs22 단백질은 발생중인 치아기에서는 발현되지 않았고 주변 치아주머니의 세포와 주위의 뼈세포에서 약하게 발현되었다(Fig. 3). 사기질 형성 시기인 생후 7일의 위턱뼈 첫째어금니 조직표본에서 PDLs22 단백질은 치수를 포함한 상아모세포와 사기질모세포와 하방 중간층(stratum intermedium)에서는 발현되지 않았으나 바깥치아상피와 하방의 별그물에서는 약하게 발현되었다(Fig. 4).

치아뿌리가 형성되기 시작하는 시기인 생후 14일의 위턱뼈 첫째어금니 조직표본에서 PDLs22 단백질은 역시 바깥치아상피와 하방의 별그물에서 발현되었고 이러한 발현은 발생중인 치아뿌리 상아질에 인접한 HERS(Hertwig's epithelial sheath)의 바깥치아상피에서의 발현으로 이어졌다(Fig. 5). 고배율을 통해 확인한 결과 PDLs22 단백질은 상아모세포를 비롯한 치수내의 세포에서는 발현되지 않았고 시멘트질과 이틀뼈가 형성되는 부위의 세포에서는 강하게 발현되었으며, 발생중인 치주인대의 중간부위에서는 약하게 발현되었다(Fig. 6).

생후 14일 아래턱뼈 절치 치아뿌리의 절단면 표본에서 시멘트질과 뼈가 형성되는 양측의 치아주머니의 세포에서 PDLs22 단백질이 강하게 발현됨이 확인되었다(Fig. 7). 고배율 소견에서 PDLs22 단백질은 발생중인 치주인대의 중심부에서는 약하게 발현된 반면 시멘트질과 뼈가 형성 중인 치주인대 양측의 세포에서는 강하게 발현되었다. 뼈와 인접된 부위의 세포들에서의 발현을 살펴보면 형성 중인 뼈에 바로 인접된 뼈모세포와 뼈기질 내부에 존재하는 뼈세포에서는 발현을 보이지 않는 반면 뼈모세포 전구세포(pre-osteoblast)라 명명할 수 있는 뼈모세포 전단계세포에서 강한 발현을 나타내었다(Fig. 8). 치아뿌리의 형성이 마무리되는 생후 21일의 조직표본에서 PDLs22 단백질은 중앙의 치주인대 세포에서는 약하게 발현되는 반면 뼈나 시멘트질에 인접된 치주인대에서는 강하게 발현되었다(Fig. 9).

고 찰

치주질환 치료의 궁극적인 목적은 소실된 연조직의 결합조직 뿐만 아니라 시멘트질과 치주인대 및 이틀뼈를 완전하게 재생시켜 정상적인 치아주위조직의 부착을 이루는 것이다(Amar, 1996). 치주 치료 후에 발생하는 치유형태는 치주 치료 후에 생성된 치유 공간 내로 먼저 채소집 되는 세포에 의해 달라지게 되는데(Nyman *et al.*, 1982; Aukhil *et al.*, 1986; Iglhaut *et al.*, 1988), 잇몸의 결합조직에는 간엽조직 기원의 섬유모세포, 대식세포, 미분화 간엽세포 및 혈관세포 등이 분포하고 있는 반면에 치주인대에는 이틀뼈측에 뼈모세포와 뼈파괴세포; 치주인대의 중심측에 섬유모세포, Malassez 상피세포, 대식세포, 미분화 간엽세포, 신경요소 그리고 혈관내피세포; 치아뿌리측에 시멘트질모세포 등의 다양한 세포들, 즉 치주인대 내에는 시멘트질, 치주인대 및 이틀뼈를 재생시킬 수 있는 세포성분이 존재하는 것으로 알려져 있다(Ramakrishnan *et al.*, 1995; San Miguel *et al.*, 1998).

시멘트질과 이틀뼈를 형성하는 세포로의 분화가 가능한 세포가 치주인대 세포내에 존재할 가능성은 제시되었으나 이들 세포들이 실제 뼈와 시멘트질을 형성하는 세포로의 분화기전에 관한 연구는 미비한 실정이다. 이를 위해서는 먼저 치아를 지지하며 시멘트질과 이틀뼈를 형성하고 또한 다양한 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가진 치주인대 세포의 발생과 분화와 관련한 분자생물학적 기전에 관한 연구가 필수적 요소라고 할 수 있다.

배자의 발생과 이에 따르는 여러 기관의 분화는 상피-간엽간의 상호작용과 각 기관의 특징적인 세포분화에 의하여 이루어진다. 치아의 발생 뿐만 아니라 치주조직 발생 또한 상피-간엽간의 순차적이고 상호보완적인 신호전달에 의해 조절되는데 치아주머니의 세포들은 HERS(Hertwig's epithelial root sheath)의 하방 이주를 시작으로 하여 시멘트질, 치주인대 및 이틀뼈를 형성하는 세포로 분화하게 된다(Cho & Garant, 2000). HERS는 내, 바깥치아상피(inner and outer dental epithelium)에서 유래된 두 층으로 구성되고 그 중 내치아상피는 치아관측 상아질을 형성시킨 방식과 유사한 방식으로 치아뿌리의 상아질을 형성하도록 유도한다(Ruch, 1998). Slavkin *et al.*(1989)은 HERS가 enamelin과 amelogenin과는 다른 polypeptide를 분비한다고 보고하였고, Bosshardt & Nanci(1998)는 bone sialoprotein, osteopontin과 enamelin이 HERS의 세포에서 일시적으로 분비된다고 보고하였는데 이러한 기질의 polypeptide가 인접한 치아주머니의 세포를 시멘트질모세포 전구세포나 섬유모세포로 분화시키는 유도인자인지에 대해서는 밝혀지지 않았으나 HERS와 동시에 배양된 섬유모세포에서 rough endoplasmic reticulum과 Golgi complex가 많아지고 분비과립과 콜라겐의 합성이 증가된 것

을 확인함으로써 HERS 세포의 분화유도 능력에 대해서는 실험을 통해 확인되었고(Thomas & Kollar, 1988), 실제 임상 조직재생술에서 치아기(dental organ)의 상피 기원 단백질인 Emdogain은 시멘트질 형성을 촉진하는 것으로 증명되고 있다(Hammerstrom, 1997).

치주인대 세포가 Dexamethasone이 함유된 배양 배지에서 배양되었을 때 치주인대 세포는 석회화 조직 형성세포로 분화하게 된다(Cho *et al.*, 1992; Ramakrishnan *et al.*, 1995). Dexamethasone이 존재하는 가운데 confluent monolayer의 세포들은 분화가 진행되면서 크기와 수가 증가하여 세포 집합체를 형성하게 되고 multilayered cluster를 형성하게 된다. 세포들은 또한 ON과 OC과 같은 비교원질성 뼈기질 단백질을 합성 분비하게 된다(Nohutch *et al.*, 1996; Jing *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 2002). 세포 집합체는 치밀한 결절이 되고 결국 뼈기질 단백질과 연관되어 무기질이 침착되어 석회화 결절이 형성되게 된다. 이번 연구에서도 배양 14일의 세포집합체에서 석회화 결절 형성이 Alizarin-Red S 염색으로 확인되었다(Fig. 1). 이번 연구에서 세포 분화 단계에 따른 ON, OC 및 PDLs22의 mRNA 수준을 증명한 결과 OC은 처음 무기질 형성 배지를 첨가하지 않은 0일에서부터 석회화가 시작되는 단계인 14일까지 일정하게 발현이 유지되었다. OC은 분화된 뼈모세포나 시멘트질모세포의 marker 단백질로 배양 처음단계에서 석회화 단계까지 발현을 보인다는 것은 배양된 치주인대 세포가 뼈나 시멘트질을 형성하는 세포의 특성을 보였다는 것을 의미한다. ON mRNA는 배양 시작 후 4일, 7일까지는 발현이 유지되다가 석회화 결절의 형성이 시작되는 시점인 14일에는 발현이 다소 감소되는 소견을 보였다. 이는 Rahime *et al.* (1997)의 연구결과와 일치한 것으로 이러한 *in vitro*에서 석회화 결절의 형성 동안의 감소된 ON의 발현은 ON이 뼈와 시멘트질 세포의 초기 분화과정이나 뼈나 시멘트질의 석회화 전단계에서 관여함을 의미한다. PDLs22 또한 ON의 발현양상과 유사한 형태를 보여 역시 뼈나 시멘트질의 초기 분화나 석회화 전단계에서 어떠한 기능을 하는 것으로 추정해 볼 수 있다.

면역조직학적 염색 소견에서 PDL22 단백질은 치아밖의 치아주머니의 세포에서 약한 발현을 보였고 이후 사기질 형성 시기인 생후 7일에서는 발생중인 사기질 상방의 바깥치아상피와 별그물에서 발현이 나타났고 이러한 발현은 치아 뿌리형성 시기의 HERS의 바깥치아상피층까지 이어졌다. PDLs22 단백질이 상아질의 발생을 유도하고 사기질을 형성하는 기능적 단위인 내치아상피와 중간층(stratum intermedium)에서는 발현되지 않고 바깥치아상피와 별그물에서만 발현되었다는 사실은 주목할 만 한데, 이들 상피세포들은 치아 뿌리와 치주조직 발생에 시발점으로 작용되는 HERS로 이어져 치주조직 발생에 영향을 미치기 때문이다(Cho & Garant, 2000). 치아뿌리의 상아질이 HERS의 내치아상피에 의해 유

도된다는 사실은 밝혀졌으나(Ruch, 1998), 시멘트질의 형성에 관여하는 인자에 대한 연구가 미비한데 우리의 결과는 HERS의 바깥치아상피가 내치아상피와는 다른 표현형을 보이면서 시멘트질의 형성에 관여할 것으로 추정되고 이러한 과정에서 PDLs22는 바깥치아상피와 치아주머니의 세포간의 관계에서 중요한 매개체 역할을 할 것으로 예상된다.

치주조직 형성시기 때 PDLs22 단백질은 분화 중인 치아주머니 세포에서 강하게 발현되었는데 특히 치주인대 세포의 중앙보다는 양측, 즉 이틀뼈와 시멘트질이 형성중인 쪽에서 강하게 발현되었다. 또한 뼈와 인접되어 뼈기질을 생성하는 뼈모세포와 뼈기질 내부의 뼈세포에서는 발현을 보이지 않았고 오히려 뼈모세포 전구세포에서 강한 발현을 보였다. 이는 PDLs22 단백질이 치아주머니 세포의 성숙과 뼈와 시멘트질의 형성 초기에 관여하는 것으로 해석할 수 있다. 또한 뼈모세포 전구세포에서는 발현되고 뼈모세포나 뼈세포에서 발현되지 않는 면역조직화학적 결과는 치주인대 세포의 *in vitro* 석회화 결절 형성 실험에서 PDLs22 mRNA가 석회화가 진행될수록 발현이 감소되는 것과 일치된 결과라 할 수 있다.

요약하면 치주인대-특히 유전자 PDLs22는 치아관 형성시기의 바깥치아상피와 별그물에서 발현되기 시작하여 HERS의 바깥치아상피로 이어지며 본격적으로 뼈와 시멘트질을 형성하기 위한 준비단계의 세포에서 강하게 발현됨으로 보아 PDLs22는 치주조직 발생에 있어 상피-간엽간의 중요한 매개물질로 작용하며, 뼈모세포나 시멘트질모세포의 분화, 특히 뼈와 시멘트질 형성의 초기 분화 과정에 중요한 역할을 할 것으로 고려된다. 더불어 PDLs22가 바깥치아상피의 성분으로 존재하다가 어떠한 기전에 의해 치아주머니의 세포를 성숙시키고 뼈와 시멘트질을 형성하는 세포로 분화시키는 지와 실제 PDLs22의 치주조직 재생에 이용 가능성을 이해하기 위해서는 PDLs22의 RNA interference와 overexpression 그리고 knock/out 생쥐의 제작과 같은 기능 연구가 계속 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Amar S : Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration, *Anatomical Record* 245: 361-373, 1996.
- Aukhil I, Pettersson E, Suggs C : Guided tissue regeneration. An experimental procedure in Begle dogs, *J Periodontol* 57: 727-734, 1986.
- Bosshardt DD, Nanci A : Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner and outer epithelial cells, *J Histochem Cytochem* 46: 135-142, 1998.
- Canalis E, McCarthy T, Centrella M : Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation *in vitro*, *J Clin Invest* 81: 1572-1577, 1988.
- Cho M-I, Lin W-L, Garant PR : Occurrence of epidermal growth

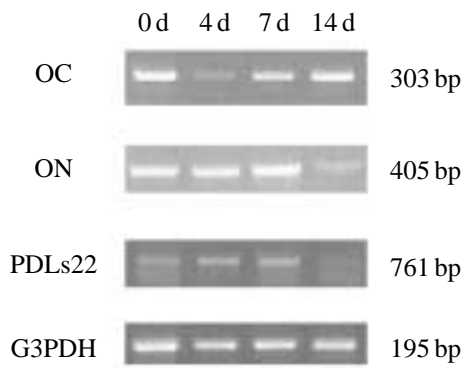
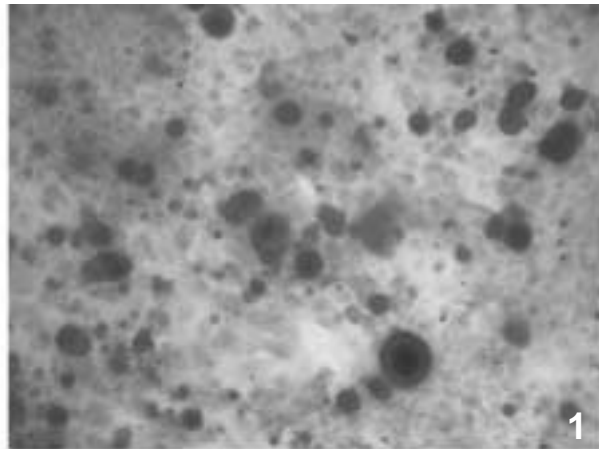
- factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat: A light and electron microscopic radiographic study, *Anat Rec* 231: 14-24, 1991.
- Cho MI, Matsuda N, Lin W-L, Moshier A, Ramakrishnan PR : *In vitro* formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat, *Calcif Tissue Int* 50: 459-467, 1992.
- Cho MI, Garant PR : Development and general structure of the periodontium, *Periodontology* 2000 24: 9-27, 2000.
- Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG : Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts, *J Periodontol* 65: 641-648, 1994.
- 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.
- Duarte WR, Kasugai S, Imiura 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: 1694-1699, 1998.
- Goseki T, Shimizu N, Iwasawa T, Takiguchi H, Abiko Y : Effects of *in vitro* cellular aging on alkaline phosphatase, cathepsin activities and collagen secretion of human periodontal ligament derived cells, *Mech Ageing Dev* 91: 171-183, 1996.
- Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports, *J Clin Periodontol* 13: 604-616, 1986.
- Hammerstrom L : Enamel matrix, cementum development and regeneration, *J Clin Periodontol* 24: 658-668, 1997.
- Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katuura 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.
- Howes R, Bowness JM, Grotendorst GM, Marting GR, Reddi AH : Platelet-derived growth factor enhances demineralized bone matrix-induced cartilage and bone formation, *Calcif Tissue Int* 42: 34-38, 1988.
- Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC, Koch G : Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds, *J Periodontal Research* 23: 107-117, 1988.
- Jing XZ, Yasuyuki S, Ichiro T, Itaru M, Manabu K : Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats, *The Histochemical Journal* 33: 25-35, 2001.
- Johnson PW, Lancero BS : Function of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in the presence of methyl mercaptan, *Quintessence Int* 30: 343-349, 1999.
- Kawase T, Sato S, Deguchi S, Kato Y, Saito S : Character of osteoblastic-fibroblast derived from human periodontal ligament *in vitro*, *Bull Kanagawa Dent Coll* 18: 135-141, 1990.
- McCulloch CAG : Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration, *Periodontology* 2000 1: 16-25, 1993.
- McCulloch CAG, Bordin S : Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology, *J Periodontal Res* 26: 144-154, 1991.
- Melcher AH : Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of the periodontal ligament on osteogenesis, *Arch Oral Biol* 15: 1183-1204, 1970.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B : The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, *Cell* 108: 17-29, 2002.
- Nilda A, John JS, Jennifer M, Ruth AF, Martha J : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro*, *J Periodontol* 62: 499-503, 1991.
- Nohut RM, McCauley LK, Shigeyama Y, Somerman MJ : Expression of mineral associated proteins by periodontal ligament cells: *in vitro* vs. *ex vivo*, *J Periodontal Res* 31: 369-372, 1996.
- Nohut RM, Somerman MJ, McCauley LK : Dexamethasone enhances the effects of parathyroid hormone (PTH) on human periodontal ligament cells *in vitro*, *Calcif Tissue Int* 56: 571-577, 1995.
- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J : The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey, *J Clin Periodontol* 9: 257-265, 1982.
- Oliver F, Manuel H, Marcel J, Andrea B, Dirk S, Igor B, Walter D, Michael H, Ivan M : Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation *in vitro*, *J Cell Biochem* 85: 737-746, 2002.
- 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* 282(5): 1145-1153, 2001.
- Rahime M Nohut, Laurie K McCauley, Amy J Koh, Martha J Somerman : Expression of Extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization *in vitro*, *J Periodontol* 68: 320-327, 1997.
- Ramakrishnan PR, Lin W-L, Sodek J, Cho M-I : Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal cells *in vitro*, *Calcif Tissue Int* 57: 52-59, 1995.
- Reddi AH, Cunningham NS : Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins, *J Bone Miner Res* 8(suppl 2): S499-502, 1993.
- Ruch JV : Odontoblast commitment and differentiation, *Biochem Cell Biol* 76(6): 923-938, 1998.
- 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 Periodontal Res* 33: 428-433, 1998.
- Slavkin HC, Bringas P, Besssem C, Santos V, Nakamura M, Hsu

MY, Snead ML, Zichner-David M, Fincham AG : Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium, *J Periodontal Res* 24: 28-40, 1989.

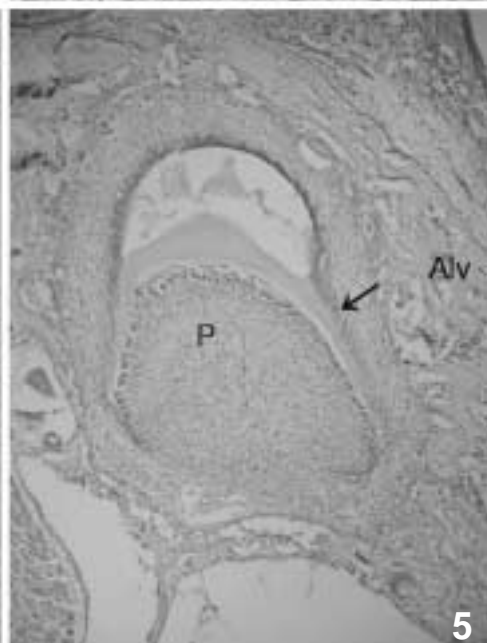
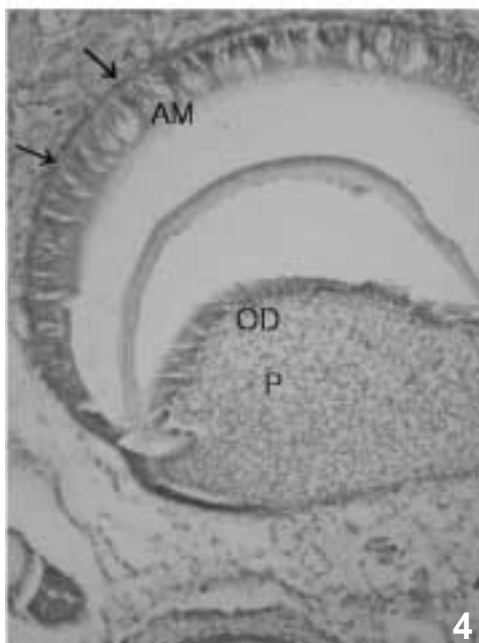
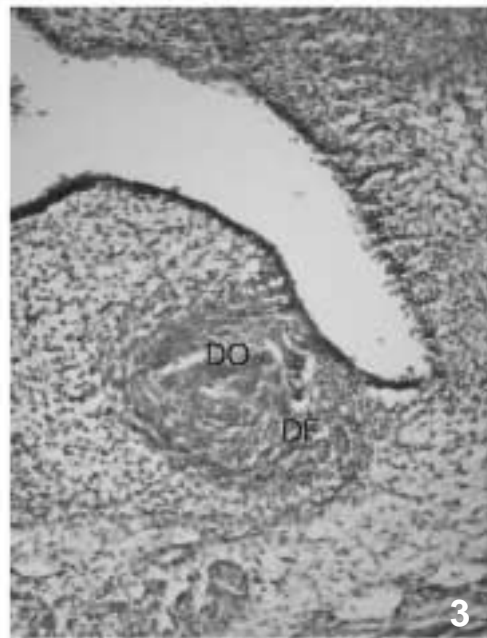
Thomas HF, Kollar EJ : Tissue interactions in normal murine root development. In: Davidovitch Z, ed. The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption, *Birmingham, AL : EBSCO Media* 15-151, 1988.

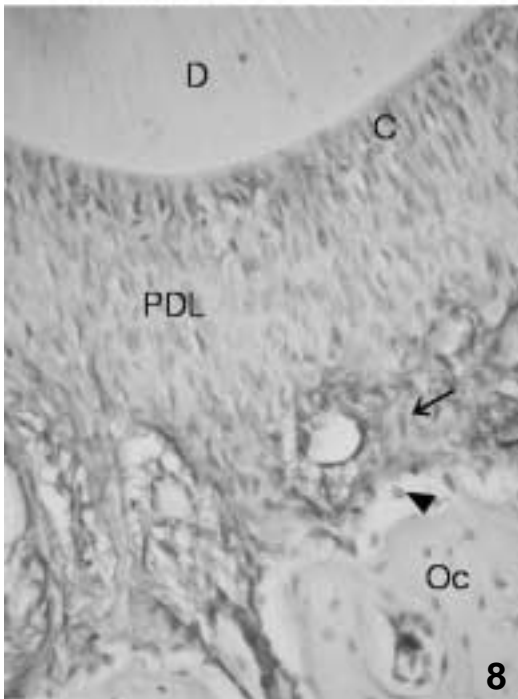
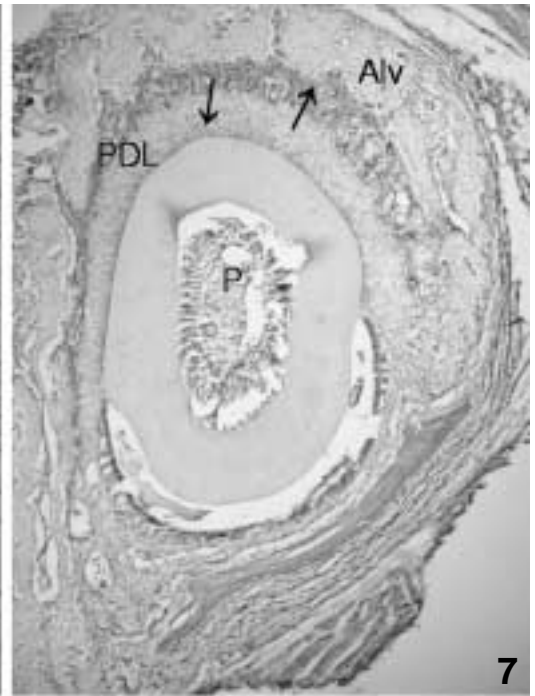
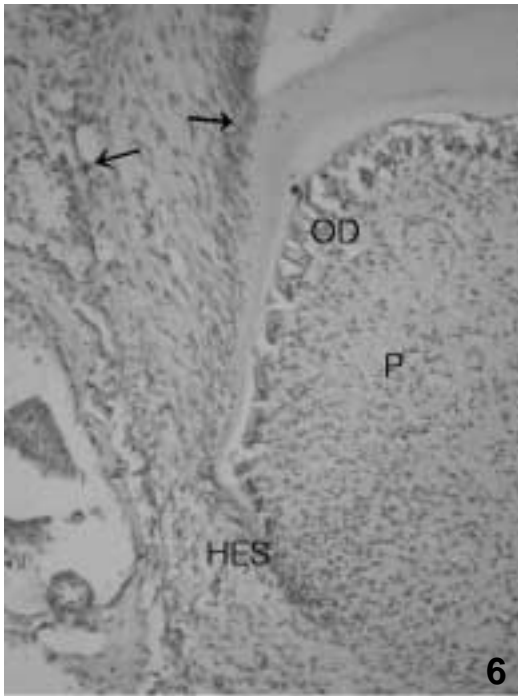
Legends for Figures

- Fig. 1.** Visualization of mineralization nodules by Alizalin-Red S stain after 14 days of culture, $\times 100$.
- Fig. 2.** RT-PCR amplification of OC, ON, PDLs22 and G3PDH transcripts in the culture of human PDL cells. Total RNAs were extracted from cultured cells after 0, 4, 7 and 14 days of culture. G3PDH used as a control. Size are indicated at right. OC, osteocalcin; ON, osteonectin; G3PDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.
- Fig. 3.** Immunohistochemical localization of PDLs22 proteins in rat mandibular first molar at embryonic day 16. PDLs22 proteins are slightly expressed in developing tooth follicle, but not in dental organ. DO, dental organ; DF, dental follicle, $\times 100$.
- Fig. 4.** Immunohistochemical localization of PDLs22 proteins in rat maxillary first molar at postnatal day 7. PDLs22 proteins are only expressed in external dental epithelium and stellate reticulum (arrows), but not in odontoblast, pulp, internal dental epithelium and stratum intermedium. AM, ameloblast; OD, odontoblast; P, pulp, $\times 100$.
- Fig. 5.** Immunohistochemical localization of PDLs22 proteins in rat maxillary first molar at postnatal day 14. PDLs22 proteins are expressed in external dental epithelium of Hertwig's epithelial root sheath (arrow). Alv, alveolar bone; P, pulp, $\times 40$.
- Fig. 6.** Immunohistochemical localization of PDLs22 proteins in rat maxillary first molar at postnatal day 14. PDLs22 proteins are expressed in bone and cementum-related side of the PDL (arrows). OD, odontoblast; P, pulp; HES, Hertwig's epithelial root sheath, $\times 100$.
- Fig. 7.** Immunohistochemical localization of PDLs22 proteins in rat mandibular incisor at postnatal day 14. PDLs22 proteins are strongly expressed in bone and cementum-related side of the PDL (arrows). Alv, alveolar bone; PDL, periodontal ligament; P, pulp, $\times 40$.
- Fig. 8.** Immunohistochemical localization of PDLs22 proteins in rat mandibular incisor at postnatal day 14. In the developing bone, PDLs22 protein is only expressed in preosteoblast (arrow) not osteocyte (Oc) and osteoblast (arrowhead). D, dentin; C, cementum; PDL, periodontal ligament; Oc, osteocyte, $\times 200$.
- Fig. 9.** Immunohistochemical localization of PDLs22 proteins in rat mandibular incisor at postnatal day 21. PDLs22 proteins are strongly expressed in bone and cementum-related side of the PDL and weakly expressed in the middle of PDL. Also PDLs22 proteins are not expressed in alveolar bone. D, dentin; P, pulp; PDL, periodontal ligament, $\times 100$.



2





— Abstract —

Expression of Periodontal Ligament Fibroblast-specific Gene, PDLs22 During Development of Periodontal Ligament, Alveolar Bone and Cementum

Suk Ji¹, Byung-Ock Kim¹, Heung-Joong Kim²,
Sung-Mi Kim, Joo-Cheol Park*

Department of ¹Periodontology, ²Oral Anatomy, Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University

Identifying specific factors and/or mechanism regulating development of periodontal tissue will provide important information as to which molecules and cells are required for regulation of periodontal tissue lost as a consequence of disease.

The origin and location of cementoblast and osteoblast precursor cells in adult periodontal tissues is not definitely known but it has been suggested that tooth related periodontal ligament may be the source of cementoblasts and the bone-related periodontal ligament for osteoblasts. However, little is known of the molecular mechanism controlling PDL function. PDL-specific protein; PDLs22 had been previously identified as a novel protein isolated from cultured human PDL fibroblasts using subtraction hybridization between human gingival fibroblasts and PDL fibroblasts. The aim of this study was to examine the functional characterization of PDLs22 in differentiation of periodontal ligament, alveolar bone and cementum. Human osteocalcin (OC), osteonectin (ON) and PDLs22 mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in primary cell cultures of periodontal ligament fibroblast during mineral nodule formation *in vitro*. And the localization of PDLs22 in rat tissues was detected by polyclonal antibody against PDLs22 by means of immunohistochemical staining.

The results were as follows:

1. PDL cells were capable of producing mineral-like nodules *in vitro*.
2. PDLs22 mRNA was expressed in the initial stages whereas it was not expressed in the calcification stage, during mineral nodule formation of PDL cells *in vitro*.
3. PDLs22 protein was expressed in external dental epithelium and stellate reticulum during crown formation stage, and was continued in external dental epithelium of Hertwig's epithelial sheath. Also PDLs22 protein was strongly expressed in the bone and cementum-related side of the PDL and weakly expressed in the middle of PDL. In the developing bone, PDLs22 protein is only expressed in preosteoblast not osteocyte and osteoblast.

The results suggest PDLs22 is important mediator of epithelial-mesenchymal reaction in development of PDL, alveolar bone and cementum and is related to initial differentiation of cementum and alveolar bone.

Key words : PDL, PDLs22, Specific gene, Alveolar bone, Cementum