

# 발생중인 생쥐 치아 및 치주조직에서 치주인대-특이 단백질; PDLs22의 발현

박중원 · 박병기 · 김상목 · 김병욱 · 박주철\*

조선대학교 치과대학 치주과학교실, 구강조직학교실\*

## I. 서론

치주조직은 치은, 치주인대, 백악질 그리고 치조골로 구성된 연조직과 경조직을 모두 포함하는 복잡한 기관이다. 치은은 치아의 지지와 저작과정에 관여하는 단순 결합조직인 반면에, 치주인대는 치아와 치조골 사이에 위치하여 치아를 악골에 부착 지지하며, 저작력과 같은 다양한 방향의 기계적 스트레스에 저항하고, 또한 감각기능을 하는 고도로 분화된 세포성 결합조직이다<sup>9)</sup>. 치은의 세포성분을 보면 간엽조직 기원의 섬유모세포, 대식세포, 미분화 간엽세포 및 혈관세포 등이 분포하고 있는 반면에, 치주인대는 치조골측에 골모세포와 파골세포; 치주인대의 중심측에 섬유모세포, Malassez 상피세포, 대식세포, 미분화 간엽세포, 신경 요소 그리고 혈관내피세포; 치근측에 위치하고 있는 백악모세포 등의 다양한 세포들로 구성되어 있다<sup>33,35,36)</sup>. 치주인대의 형성과정은 상피-간엽, 상피-경조직 상호관계에 의해 Hertwig 상피근초를 구성하는 내외치세포가 있는 상황에서 외배엽성 간엽 기원의 미분화간엽세포가 분화하여 치주인대 섬유모세포를 만들고 이 세포에 의하여 치주인대가 형성되는 것으로 요약 할 수 있으나, 미분화간엽세포에서 치주인대 섬유모세포가 분화하는 과정에 관하

여는 잘 알려져 있지 않으며 특히 그 분자생물학적 기전에 관하여는 연구가 더욱 미미한 실정이다.

치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 특성 비교에 관한 몇몇 분자생물학적 연구에 의하면, 치주인대에 존재하는 세포들에서 특징적으로 발현되는 유전자들로 Duarte<sup>13)</sup> 등은 S100 칼슘결합단백계 (S100 calcium-binding protein family)의 일종인 S100A4와 S100A2 칼슘결합단백을 보고하였고, Horiuchi<sup>17)</sup> 등은 osteoblast-specific factor로 알려진 periostin을 보고하였다. S100A4와 S100A2는 소의 치주조직에서 분리되었는데, 그 중 S100A2는 치주인대 뿐만 아니라 치은에서도 존재하는 것으로 밝혀져 치주인대의 발생과 분화와 관련하여 치주인대에서 특이적인 기능을 기대할 수 없게 되었고, S100A4는 치은에 비하여 치주인대에서 선택적으로 발현되거나 배양골수세포나 치주인대세포에 S100A4를 투여하면 석회화 소결절의 형성이 억제되는 것으로 알려져있다<sup>14)</sup>. 따라서 S100A4는 치주인대 섬유모세포의 초기 발생이나 분화에 관여하기보다는 치주인대 형성후에 치주인대의 석회화를 방해하여 치주인대의 폭경을 유지하는 것으로 생각되고 있다. 한편, 골모세포주인 MC3T3E1 세포주에서 골모세포에 특이한 인자로 최초 분리된 페리오스틴은 골막과 치주인대에 조

직 특이적으로 발현되며 그 발현이 TGF- $\beta$ 에 의해 조절된다고 알려져 있으나<sup>19)</sup>, 골막에서는 골형성초기에 골모세포를 모여들게 하고 부착하는 데 관여하며 치주인대에서도 치주인대에 존재하는 골모세포들의 발생과 분화과정에 관여하는 것으로 생각할 수 있다. 결국 현재까지 치주인대 섬유모세포의 분화나 발생에 선택적으로 관여하는 유전자에 관한 연구는 미미한 실정이다.

치주조직을 구성하는 치은의 섬유모세포와 치주인대의 섬유모세포는 인접하게 위치하며 같은 섬유모세포군에 속하지만 그 발생학적 기원이 다르다<sup>12,15,21,23,39)</sup>. 치은 섬유모세포는 간엽기원으로 주로 치은결합조직을 유지하는 데 관여하는 반면, 치주인대 섬유모세포는 외배엽성 간엽기원으로 치주인대를 형성할 뿐만 아니라 생체내에서의 인접 치초골 및 백악질의 수복과 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>1,20,24,26,38)</sup>. 또한 치주인대 섬유모세포는 동종의 세포만으로 구성된 것이 아니라, 표현형과 기능이 상이한 여러 아개체(subpopulation)의 세포로 이루어져 있다<sup>6,7,37,49)</sup>. 나이가 이들 세포는 높은 알카리성 인산 분해효소 활성, 부갑상선 호르몬에 대한 반응성, 골유사 기질 폴리펩타이드의 생산 및 석회화된 소결질의 형성과 같은 골모세포의 표현형들을 발현하기도 하는 등 그 특성에서도 치은 섬유모세포와 많은 차이점을 나타낸다<sup>3,11,17,18,46,48)</sup>.

최근에 Park 등<sup>31)</sup>은 치주조직의 재생을 유도할 수 있는 분화유도 인자에 관한 연구에서, 일반 결합조직의 섬유모세포인 치은 섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포가 선택적으로 발현되는 유전자가 치주인대의 발생과 분화과정에 중요한 역할을 할 수 있다는 논리를 바탕으로 배양 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포사이의 유전자들을 subtraction 방법으로 비교하여 PDLs22를 포함한 5개의 후보유전자가 치은 섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포에 선택적으로 발현됨을 보고하였다.

본 연구의 목적은 발생중인 생쥐의 치주조직에서 치주인대 섬유모세포-특이 유전자로 알려진 PDLs22 단백질의 분포를 다클론성 항체제작과 면역조직화학적 염색을 통하여 확인함으로써 PDLs22 단백질의

치주조직 발생과 분화와 관련한 역할을 규명하는 데 있다.

## II. 연구재료 및 방법

### A. 실험동물 및 조직 절편 제작

#### 1. 실험동물

태생 18일, 출생 1일, 4일, 5일, 15일, 18일의 생쥐를 각 시기별로 4~6마리씩 암, 수 구별 없이 사용하였다.

#### 2. 조직 절편 제작

생쥐 머리를 4% paraformaldehyde 용액에 4°C에서 overnight 시킨 후, PBS용액으로 2시간 세척하고 10% EDTA 용액에 4°C에서 2~4주간 탈회하였다. 탈회를 확인한 다음, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV 알콜로 각각 12시간씩 탈수하였다. Chloroform 용액에서 2시간씩 4회 처리한 후 paraffin에 포매하였다. 6 $\mu$ m 두께로 박절한 후, ethoxysilan-coated 슬라이드에 올려 면역조직화학적 염색 때까지 4°C에 보관하였다.

### B. 면역조직화학적 염색을 위한 PDLs22 단백질에 대한 항체의 제작

사람 PDLs22의 폴리펩타이드 영역에서 펩타이드 ISNKYLVKQRSRD를 선택, 주문 합성하였다. 펩타이드들은 자동 펩타이드 합성기 (모델 430; Applied Biosystems, USA)의 보조하에 고상 절차를 사용하여 화학적으로 합성하였다. 합성 펩타이드를 MBS 커플링 방법에 의해 설피히드릴기를 통해 담체 폴리펩타이드인 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)에 접합시켰다. 1ml의 완전 프로인트 보조제 (complete Freund's adjuvant)를 이용하여 KLH에 접합시킨 합성 펩타이드 항원용액 (100 $\mu$ g/ml)을 안정하게 부유화시킨 후 토끼 림프 결절에 주입하여 1차 면역시켰다. 3주후 100 $\mu$ g/ml의 항원으로 2차 면역후, 다시 10일후 50 $\mu$ g/ml의 항원 용액으로 3차 면역시켰다. 10



였다. PBS로 40분 동안 세척한 후, 단편을 2차 항체로서 0.5% BSA를 포함한 PBS로 희석 (1drop/0.5% BSA sol 10ml)한 염소 항토끼 IgG항체 (Vector Lab, USA)와 실온에서 1시간 동안 항은 처리하였다. PBS로 20분 동안 세척한 후, 단편을 사용하기 30분전에 PBS로 희석한 ABC 시약(Vector Lab, USA)과 45분 동안 반응시켰다. PBS로 20분 동안 세척한 후 0.05% DAB (Deaminobenzidine Tetrahydrochloride)를 이용한 비색반응으로 발색시킨 후, 절편을 세척하고 헤마톡실린으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### III. 연구결과

#### A. 면역조직화학적 염색을 이용한 PDLs22 단백질의 조직내 분포확인

##### 1. 뇌상기 (bud stage)와 모자상기 (cap stage)

PDLs22 단백질의 발현은 뇌상기와 모자상기의 치배에서는 관찰되지 않았다.

##### 2. 후기 종상기 (late bell stage) 및 치근형성기 (root formation stage)

PDLs22 단백질은 발생중인 치배의 치낭의 세포와 주위의 골모세포양세포들에서 강하게 발현되었다 (Fig. 2). 치배의 법랑모세포 및 상아모세포에서는 PDLs22 단백질의 발현을 확인할 수 없었으나, 상아모세포 하방의 전상아모세포에서는 PDLs22 단백질의 발현이 관찰되었다 (Fig. 3). 발생중인 치배 위쪽의 치은 섬유모세포에서는 PDLs22 단백질이 발현되지 않았으나 발육중인 치낭과 치수 특히 상아모세포 하방의 전상아모세포에서 강한 발현이 관찰되었다 (Fig. 4, 5).

##### 3. 맹출치아(erupted tooth)

치아를 둘러싸는 치주인대와 치조골의 골모세포양 세포에서 PDLs22 단백질이 강하게 발현되었으나, 치은 섬유모세포, 골세포 및 인접 타액선 등에서는 PDLs22 단백질이 발현되지 않았으며, 치수내의 세포

들에서도 후기 종상기 및 치근형성기에 비하여 그 발현이 감소되는 소견을 보였다 (Fig. 6, 7).

#### 4. 치조골 및 정중 구개골 봉합 (mid-palatal suture)

PDLs22 단백질은 치조골의 골모세포양 세포와 발육중인 정중 구개골의 간엽세포 및 골모세포양 세포에서 발현되었으나, 성숙 골세포와 연골세포에서는 발현이 관찰되지 않았다 (Fig. 8, 9).

## IV. 총괄 및 고찰

치아 발생은 상피-간엽조직의 상호작용, 분화, 형태발생 등 복잡한 생물학적 과정을 수반한다. 외배엽 기원인 치아기와 외배엽성간엽 기원인 치유두 및 치낭에서의 세포의 분화기전을 이해한다는 것은 치아 및 치주조직의 정상적인 발생과정을 이해하는 데 필수적이라 할 수 있다. 또한 이는 치아와 치주조직의 재생적 치료에 응용되어 치유를 촉진시킬 수 있을 것이다.

배아의 발생과 이에 따르는 여러 기관의 분화는 상피-간엽간의 상호작용과 각 기관의 특징적인 세포분화에 의하여 이루어진다. 치아발생은 상피-간엽간의 순차적이고 상호보완적인 신호전달에 의해 조절된다는 것을 보여준 전형적인 예이다<sup>16,41-45,47</sup>. 더욱 더 치아발생은 상피기원의 법랑질 뿐만 아니라 골과 비슷한 상아질과 백악질과 같은 외배엽성간엽 기원의 경조직 형성을 특징으로 한다. 치아의 발육과정에서 치유두 간엽세포는 상아모세포로 분화되고, 내치상피세포는 법랑모세포로, 치낭의 세포들은 치주인대 섬유모세포, 백악모세포 및 치조골의 골모세포로 분화하는데 이러한 세포분화와 활성으로 인하여 치아의 발육이 이루어진다. 미분화간엽세포가 특이한 세포로 분화하기 위해서는 그 시기에 발현되는 유도인자가 있을 것이며, 이러한 분화과정은 상피-간엽간의 상호작용에 의해 조절된다고 알려져 있다. 치아의 각 부위를 분화시키고 발육시켜 맹출하도록 하는 인자가 무엇인지 해답을 얻기 위해서는 세포의 분화를 포함하는 일련의 발육과정에 어떤 인자들이 관계하는가를 규명해야 할 것이다.

치주질환의 치료는 손상된 치주인대와 치조골을 재생 또는 복원하여 건강한 치아와 치주조직이 유지 되도록 하는 것이다<sup>2,22)</sup>. 이를 위해서는 먼저 치아를 지지하며 백악질과 치조골을 형성하고 또한 다양한 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가진 치주인대 섬유모세포의 발생과 분화와 관련한 분자생물학적 기전에 관한 연구가 필수적 요소라고 할 수 있다<sup>4,5,27,34,40)</sup>.

현재까지의 치주인대의 발생과 분화에 관한 연구들을 요약하면, 1980년대에는 치주인대세포들의 형태학적 및 기능적 특성을 규명하는 연구들이 주로 이루어졌으며, 1990년대에는 치주인대세포의 epidermal growth factor (EGF) binding site, 치주인대세포의 제XII형 교원질과 S100 칼슘결합단백계 (S100 calcium-binding protein family)의 발현 및 최근에는 치주인대세포의 osteoblast specific factor-2 (OSF-2, periostin)의 특이적 발현에 관한 보고들로 대별할 수 있다<sup>10,13,14,18,19,25,28,29,30,32,50)</sup>. 그러나 이러한 연구 결과들은 치주인대에 존재하는 다양한 세포들의 기능적 특성에 관한 이해 과정이라 생각할 수 있으며 최근에 발견된 “칼슘결합단백”이나 “periostin” 등도 치주인대의 발생과 분화를 전체적으로 담당하고 조절하는 치주인대 섬유모세포와는 그 관련성이 확인되지 않아서 이들을 통한 치주조직의 발생 전반에 대한 이해와 치주조직 재생에의 응용 등은 어려운 상황이다.

최근에 Park 등<sup>31)</sup>이 배양 치은 섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포에서 선택적으로 발현되어 치주인대 섬유모세포의 재생과 분화에 관여할 것으로 기대되는 치주인대 섬유모세포-특이 유전자; PDLs5, 17, 22, 25, 31을 검출하였다. 그 중에서도 PDLs22는 노던분석, mRNA 인사이투하이브리드 등의 연구에서 다른조직에 비하여 치주인대에서 선택적으로 발현되는 것으로 보고하여 치주인대의 분화와 재생과정에서 그 역할의 가능성을 시사하였다. 그러나, PDLs22이 치주조직을 포함한 다양한 조직에서 어떻게 분포하는지 또한 어떤 기능을 수행하는지 등에 관하여는 밝혀내지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 생쥐 치아발생 및 치주조직 형성동안에 치주

인대 특이-단백질로 알려진 PDLs22 단백질의 분포와 발현을 다클론성 항체제작과 면역조직화학적 염색을 통하여 연구하고자 하였다.

PDLs22의 ORF 부분을 염기서열 분석을 토대로 펩타이드를 주문 합성하고 이를 이용하여 항체를 제작한 결과 PDLs22 단백질은 치은섬유모세포, 법랑모세포, 상아모세포, 연골세포, 성숙 골세포에서는 관찰되지 않았고, 분화중인 치주인대 섬유모세포, 전상아모세포, 골모세포양 세포 및 치낭의 세포들에서 강하게 발현된다는 것을 면역조직화학적 분석을 통하여 관찰하였다. 이 결과는 골수에 존재하는 간질세포도 치주인대세포와 유사하게 다양한 세포로 분화할 수 있는 미분화 간엽세포(undifferentiated mesenchymal cells)를 포함하고 있다는 점에서 PDLs22 단백질의 발현이 확인된 것은 주목할 만하며, 이와 관련된 보다 더 깊은 연구가 시행되어야 할 것이다. 성숙 골세포(mature osteocyte)에서는 PDLs22 단백질의 발현은 거의 관찰되지 않았고, 맹출 치아의 치수내에서도 후기 종상기 및 치근형성기에 비해 그 발현이 감소되는 소견을 보였다. 이는 Park 등<sup>31)</sup>이 PDLs22 cRNA 프로브를 이용한 인사이투하이브리드 연구에서 맹출된 치아의 치수세포들에서 PDLs22 mRNA의 발현이 관찰되지 않은 연구결과와 일치하며, 또한 PDLs22가 초기 분화중인 골모세포양 세포와 전상아세포 및 치주인대 세포 등의 분화과정에서 특히 초기 과정에 관여한다는 것을 강력하게 시사하는 결과라고 할 수 있다.

본 연구를 통하여 치주인대 섬유모세포-특이 유전자 PDLs22는 치주인대의 미분화 단계의 간엽성세포에서 발현되어 치주인대 분화의 초기과정에 관여함을 알 수 있었으나 PDLs22 유전자를 이용한 치주질환의 치료와 치주조직의 재생을 도모하기 위해서는 첫째로, 미분화단계의 치주인대세포에 PDLs22 유전자를 주입하고 western 분석 등을 통하여 PDLs22 단백질의 발현을 조사하는 등의 치주인대 분화와 PDLs22의 상관관계를 명확히 규명하여야 하며, 둘째로, PDLs22 단백질에 대한 다클론성 항체를 제작하여 PDLs22 단백질의 정확한 분포와 항체에 의한 억제작용 등의 연구가 시행되어야 하며, 셋째로,

PDLs22 유전자의 프로모타와 전사인자 등에 관한 연구를 통하여 PDLs22 유전자와 다른 다양한 인자들과의 상관성 및 반응성 등에 관하여 조사하여야 하며, 넷째로, PDLs22 단백질의 구조와 세포내 합성 과정 및 분비 등에 관한 연구와 다섯째로, PDLs22 재조합 단백질의 제조 및 응용방법 등에 관한 다양한 연구가 향후 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결론

본 연구는 치주인대 섬유모세포-특이 유전자로 알려진 PDLs22가 치주조직의 발생과 분화에 미치는 영향을 규명하기 위하여 태생 18일과 출생 후 1일, 4일, 5일, 15일, 18일된 생쥐의 조직표본을 제작한 후 적절한 치아발생단계의 절편을 선택한 다음 생쥐의 치아발생단계별 치아 및 주위조직에서의 PDLs22 단백질의 발현양상을 다클론성 항체제작과 면역조직화학적 염색을 통하여 분석함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PDLs22 단백질의 발현은 뇌상기와 모자상기의 치배에서는 관찰되지 않았다.
2. 후기 종상기 및 치근형성기에 PDLs22 단백질은 발생중인 치배의 치낭의 세포와 주위의 골모세포양 세포들에서 강하게 발현되었다. 치배의 법랑모세포 및 상아모세포에서는 PDLs22 단백질의 발현을 확인할 수 없었으나, 상아모세포 하방의 전상아모세포에서는 PDLs22 단백질의 발현이 관찰되었다. 발생중인 치배 위쪽의 치은 섬유모세포에서는 PDLs22 단백질이 발현되지 않았으나 발육중인 치낭과 치수 특히 상아모세포 하방의 전상아모세포에서 강한 발현이 관찰되었다.
3. 맹출치아를 둘러싸는 치주인대와 치조골의 골모세포양 세포에서 PDLs22 단백질이 강하게 발현되었으나, 치은 섬유모세포, 골세포 및 인접 타액선 등에서는 PDLs22 단백질이 발현되지 않았으며, 치수내에서도 후기 종상기 및 치근형성기에 비하여 그 발현이 감소되는 소견을

보였다.

4. 치조골 및 정중 구개골 봉합에서 PDLs22 단백질은 치조골의 골모세포양 세포와 발육중인 정중 구개골의 간엽세포 및 골모세포양 세포에서 발현되었으나, 성숙 골세포와 연골세포에서는 발현이 관찰되지 않았다.

이상의 연구결과를 종합하여 볼 때 치주인대 섬유모세포-특이 유전자인 PDLs22는 골수의 간엽세포나 치주인대 세포 등의 세포가 다양한 세포로 분화해 가는 분화의 초기단계에서 그 분화의 조절에 관여하지만 그 정확한 작용기전에 관하여는 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. Abiko Y, Shimizu N, Yamaguchi M, Suzuki H, Tadiguchi H. Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells. *Annals Periodontol* **3**:350-369, 1998.
2. Amar S. Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration. *Anatomical Record* **245**:361-373, 1996.
3. Arzate H, Alvarez-Perez MA, Aguilar-Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. *J Periodontal Res* **33**:249-258, 1998.
4. Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, et al. Expression of mRNAs encoding for  $\alpha$  and  $\beta$  integrin subunits, MMPs and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Dent Res* **79**:1712-1716, 2000.
5. Brandsten C, Lundmark C, Christersson C, Jammarmstrom L, Wurtz T. Expression of collagen  $\alpha$ (I) mRNA variants during tooth and bone formation in the rat. *J Dent Res* **78**:11-19, 1999.
6. Carnes DL, Maeder CL, Graves DT. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from

- human gingiva and periodontal ligament. *J Periodontol* **68**:701-707, 1997.
7. Chien HH, Lin WL, Cho MI. Interleukin-1 $\beta$  induced release of matrix proteins into culture media causes inhibition of mineralization of nodules formed by periodontal ligament cells in vivo. *Calcif Tissue Int* **64**:402-413, 1999.
  8. Cho MI, Garant PR. Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat. *Anatomical Record* **245**:342-360, 1996.
  9. Cho MI, Gagant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* **24**:9-27, 2000.
  10. Cho MI, Lin WL, Garant PR. Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat: A light and electron microscopic radioautographic study. *Anatomical Record* **231**:14-24, 1991.
  11. Cho MI, Matsuda N, Lin WL, Moshier A, Ramakrishnan, PR. In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif Tissue Int* **50**:459-467, 1992.
  12. Dahan M, Nawrocki B, Elkaim R, Soell M, et.al. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *J Clin Periodontol* **28**:128-136, 2001.
  13. Duarte WR, Iimura T, Takenaga K, et.al. Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. *Biochem Biophys Res Commun* **255**:416-420, 1999.
  14. Duarte WR, Kasugai S, Imiura T, et.al. cDNA cloning of S100 calcium-binding proteins from bovine periodontal ligament and their expression in oral tissues. *J Dent Res* **77**:1694-1699, 1998.
  15. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, et.al. Short analytical review evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopatho* **72**:283-292, 1994.
  16. Heicingemo K, Begue-Kim C, Ritvos O, Tuuri T, Ruch JV. Actin and bone morphogenetic protein (BMP) signalling during tooth development. *Eur J Oral Sci* **106**:167-173, 1998.
  17. Horiuchi k, Amizuka N, Takeshita H, et.al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor- $\beta$ . *J Bone Mineral Res* **14**:1239-1249, 1999.
  18. Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res* **75**:895-902, 1996.
  19. Johnso, PW, Lancero B.S. Function of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in the presence of methyl mercaptan. *Quintessence Int* **30**:343-349, 1999.
  20. Kapila YL, Lancero H, Johnson PW. The response of periodontal ligament cells to fibronectin. *J Periodontol* **69**:1008-1019, 1998.
  21. Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. *J Dent Res* **77**:555-564, 1998.
  22. Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, Takacs V, Oates TW. Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol* **71**:226-237, 2000.
  23. Lekic K, McCulloch, CAG. Periodontal ligament cell populations: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anatomical Record* **245**:327-341, 1996.
  24. Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CAG. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J*

- Periodont Res* **36**:71-79, 2001.
25. Matsuda N, Yokoyama K, Takeshita S, Watanabe M. Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Archives of Oral Biol* **43**:987-997, 1998.
  26. Morishita M, Yamamura T, Shimazu A, Bachchu AH, Iwamoto Y. Estradiol enhances the production of mineralized nodules by human periodontal ligament cells. *J Clin Periodontol* **26**:748-751, 1999.
  27. Nishimura F, Naruishi K, Yamada H, et.al. High glucose suppresses cathepsin activity in periodontal ligament derived fibroblastic cells. *J Dent Res* **79**:1614-1617, 2000.
  28. Nishimura F, Terranova VP. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. *J Dent Res* **75**:986-992, 1996.
  29. Ogiso B, Hughes FJ, Davies JE, McCulloch CA. Fibroblastic regulation of osteoblast function by prostaglandins. *Cell Signal* **4**:627-639, 1992.
  30. Palmon A, Roos H, Reichenberg E, et.al. Basic fibroblast growth factor suppresses tropoelastin gene expression in cultured human periodontal fibroblasts. *J Periodont Res* **36**:65-70, 2001.
  31. Park JC, Kim YB, Kim HJ, et.al. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun* **20**:282:1145-1153, 2001.
  32. Parkar MH, Kuru L, Giouzeil M, Olsen I. Expression of growth factor receptors in normal and regeneration human periodontal cells. *Arch Oral Biology* **46**:275-284, 2001.
  33. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissue. *J Periodont Res* **32**:159-165, 1997.
  34. Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal cells in vitro. *Calcif Tissue Int* **57**:52-59, 1995.
  35. Rajshankar D, McCulloch CAG, Tenenbaum HC, Lekic PC. Osteogenic inhibition by rat periodontal ligament cells: modulation of bone morphogenic protein-7 activity in vivo. *Cell Tissue Res* **249**:475-483, 1998.
  36. San Miguel SM, Goseki-sone M, Sugiyama E, et.al. 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.
  37. Sawa Y, Phillips A, Hollard J, Yoshida S, Braithwaite MW. The in vivo life-span of human periodontal ligament fibroblasts. *Tissue & Cell* **32**:163-170, 2000.
  38. somerman MJ, Foster RA, Imm GM, Sauk JJ, Archer SY. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro. *J Periodontol* **60**:73-77, 1989.
  39. Strutz F, Okada H, Lo CW, et.al. Identification and characterization of a fibroblast marker:FSP1. *J Cell Biol* **130**:393-405, 1995.
  40. Takiguchi T, Kobayashi M, Nagashima C, et.al. Effect of prostaglandin E2 on recombinant human bone morphogenic protein-2 stimulated osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* **34**:431-436, 1999.
  41. Thesleff I, Hurmerinta K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation* **18**:75-88, 1981.
  42. Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P Aberg T. Epithelial mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res* **32**:9-15, 1995.
  43. Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. common molecular mechanisms regulating the development of

- teeth and other organs. *Int J Dev Biol* **39(1)**:35-50, 1995.
44. Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, Jowett A. Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anat Rec* **245(2)**:151-161, 1996.
45. Thesleff I, Sharpe PT. Signalling network regulating dental development. *Mech Del* **67(2)**:111-123, 1997.
46. Van der Pauw MT, Van Den Bos T, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor  $\beta$ 1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol* **71**:31-43, 2000.
47. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* **75**:45-58, 1993.
48. Wada N, Maeda H, Tanabe K, et.al. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function:the Factor is osteoprotegrin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Periodontal Res* **36**:56-63, 2001.
49. Wise GE, Zhao L, Grier IV RL. Localization and expression of CSF-1 receptor in rat dental follicle cells. *J Dent Res* **76**:1244-1249, 1997.
50. Ye J, Nishimura F, Oraman R, Terranova VP. Isolation, purification, and partial characterization of an autocrine periodontal ligament cell chemotactic factor. *J Dent Res* **74**:1303-1309, 1995.

## 사진부도 설명

- Figure 2. Frontal section of tooth germ at the late bell stage, labeled by immunohistochemical staining for PDLs22 polyclonal antibody( $\times 100$ ). PDLs22 was intensely expressed in developing tooth follicle (arrows), osteoblast-like cells, and sub-odontoblastic cell layer (arrowheads), but not in odontoblasts, ameloblasts, and gingival fibroblasts. OD, odontoblasts; AM, ameloblasts; GF, gingival fibroblasts.
- Figure 3. Frontal section of tooth germ at the late bell stage, labeled by immunohistochemical staining for PDLs22 polyclonal antibody( $\times 200$ ). PDLs22 was expressed in sub-odontoblastic cell layer (arrowheads) but not in ameloblasts and odontoblasts. AM, ameloblasts; OD, odontoblasts.
- Figure 4. Cross-section of tooth germ at the late bell stage and root formation stage, labeled by immunohistochemical staining for PDLs22 polyclonal antibody( $\times 200$ ). PDLs22 was expressed in developing tooth follicle (arrows) and sub-odontoblastic cell layer (arrowheads) but not in gingival fibroblasts and ameloblasts. GF, gingival fibroblasts; AM, ameloblasts.
- Figure 5. Cross-section of tooth germ at the late bell stage and root formation stage, labeled by immunohistochemical staining for PDLs22 polyclonal antibody( $\times 200$ ). PDLs22 was expressed in developing tooth follicle (arrows) and sub-odontoblastic cell layer (arrowheads) but not in gingival fibroblasts and ameloblasts. GF, gingival fibroblasts; AM, ameloblasts.
- Figure 6. Frontal section of erupted tooth, labeled by immunohistochemical staining for PDLs22 polyclonal antibody ( $\times 100$ ). PDLs22 was intensely expressed in PDL (arrows) and differentiating osteoblast-like cells (arrowheads), but not in gingival fibroblasts, mature osteocytes, and adjacent salivary gland. GF, gingival fibroblasts; MO, mature osteocytes, GL, salivary glands.
- Figure 7. Expression of PDLs22 in the PDL ( $\times 200$ ). PDLs22 was intensely expressed in PDL (arrows) but not in gingival fibroblasts and mature osteocytes. GF, gingival fibroblasts; MO, mature osteocytes.
- Figure 8. Expression of PDLs22 in the alveolar bone ( $\times 200$ ). PDLs22 was expressed by differentiating osteoblast-like cells (arrows) but not in mature osteocytes (arrowheads).
- Figure 9. Expression of PDLs22 in the mid-palatal suture ( $\times 200$ ). PDLs22 was expressed by differentiating osteoblast-like cells (arrows) but not in mature osteocytes (arrowheads).

# 사진부도 (1)



Figure 2

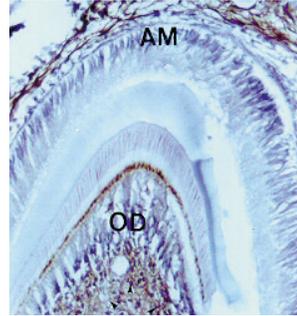


Figure 3

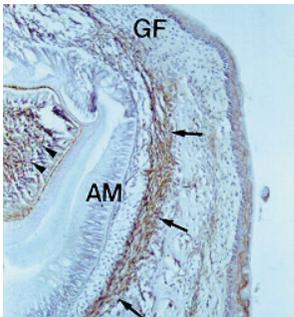


Figure 4

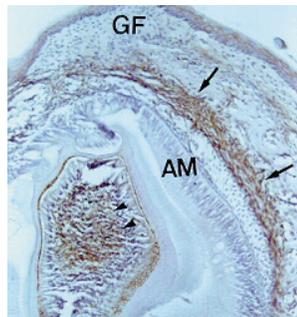


Figure 5

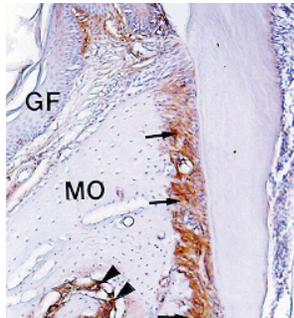


Figure 6

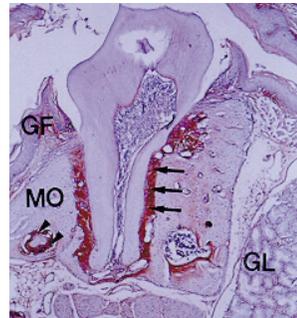


Figure 7



Figure 8

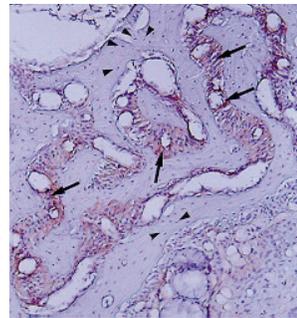


Figure 9

## Expression of PDL-specific protein;PDLs22 on the developing mouse tooth and periodontium

Jung-Won Park, Byung-Ki Park, Sang-Mok Kim, Byung-Ock Kim, Joo-Cheol Park\*

Dept. of Periodontology, Dept. of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University

The periodontal ligament(PDL) is a unique tissue that is crucial for tooth function. However, little is known of the molecular mechanisms 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 expression pattern and tissue localization of PDLs22 protein in embryonic and various postnatal stages of developing mouse using immunohistochemical staining.

Embryos (E18) and postnatal (P1, P4, P5, P15, P18) were decapitated and the heads were fixed overnight in a freshly prepared solution of 4% paraformaldehyde. Some specimens were decalcified for 2~4 weeks in a solution containing 10% of the disodium salt of ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA). Next, tissues were dehydrated, embedded in paraffin and sectioned serially at 6 $\mu$ m in thickness. Polyclonal antiserum raised against PDLs22 peptides, ISNKYLVKRQSRD, were made. The localization of PDLs22 in tissues was detected by polyclonal antibody against PDLs22 by means of immunohistochemical staining.

The results were as follows;

1. Expression of PDLs22 protein was not detected in the tooth germ of bud and cap stage.
2. At the late bell stage and root formation stage, strong expression of PDLs22 protein was observed in developing tooth follicle, osteoblast-like cells, and subodontoblastic cells in the tooth pulp, but not in gingival fibroblasts, ameloblasts and odontoblasts of tooth germ
3. In erupted tooth, PDLs22 protein was intensely expressed in PDL and osteoblast-like cells of alveolar bone, but not in gingival fibroblasts, mature osteocytes and adjacent salivary glands.
4. In the developing alveolar bone and mid-palatal suture, expression of PDLs22 protein was seen in undifferentiated mesenchymal cells and osteoblast-like cells of developing mid-palatal suture, but not in mature osteocytes and chondrocytes.

These results suggest that PDLs22 protein may play an important role in the differentiation of undifferentiated mesenchymal cells in the bone marrow and PDL cells, which can differentiate into multiple cell types including osteoblasts, cementoblasts, and PDL fibroblasts. However, more researches should be performed to gain a better understanding of the exact function of PDLs22 protein which related to the PDL cell differentiation.

---

Key words : PDL-specific protein, periodontium