

사람 치수 세포와 치주 인대 세포의 유전자 발현에 관한 비교 연구

소 현 · 박상혁 · 최기운*

경희대학교 대학원 치의학과 치과보존학교실

ABSTRACT

THE COMPARISON OF GENE EXPRESSION FROM HUMAN DENTAL PULP CELLS AND PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

So-Hyoun, Sang-Hyuk Park, Gi-Woon Choi*

Department of Conservative Dentistry, Division of Dentistry, Graduate of Kyung Hee University

The purpose of this study was to characterize functional distinction between human dental pulp cells(PC) and periodontal ligament cells(PDLC) using cDNA microarray assay and to confirm the results of the microarray assay using RT-PCR. 3 genes out of 51 genes which were found to be more expressed(>2 fold) in PC were selected, and 3 genes out of 19 genes which were found to be more expressed(>2 fold) in PDLC were selected for RT-PCR as well.

According to this study, the results were as follows:

1. From the microarray assay, 51 genes were more expressed (2 fold) from PC than PDLC.
2. RT-PCR confirmed that ITGA4 and TGF β 2 were more expressed in PC than in PDLC
3. From the microarray assay, 19 genes were more expressed (2 fold) from PDLC than PC.
4. RT-PCR confirmed that LUM, WISP1, and MMP1 were more expressed in PDLC than in PC.

From the present study, different expression of the genes between the PC and PDLC were characterized to show the genes which play an important role in dentinogenesis were more expressed from PC than PDLC, while the genes which were related with collagen synthesis were more expressed from PDLC than PC. [J Kor Acad Cons Dent 34(5):430-441, 2009]

Key word : cDNA microarray assay, human dental pulp cells, human periodontal ligament cells, RT-PCR, dentinogenesis, collagen synthesis

-Received 2009.8.4., revised 2009.9.3., accepted 2009.9.4.-

I. 서 론

치아는 형성 시에 상피세포(epithelial cell)와 치아유두세포(dental papilla cell)가 상호유도(reciprocal interaction)하여 치아를 형성한다^{1,2)}. 치아유두세포는 상아모세포(odontoblast)로 분화하여 상아질을 형성하며 일부는 미분

화중간엽세포(undifferentiated mesenchymal cell)와 섬유모세포(fibroblast)로 되어 치수(pulp)를 구성한다^{3,4)}. 치수에 존재하는 미분화중간엽세포는 외부의 자극이 가해지면 상아모세포로 분화하여 상아질을 형성할 수 있는 능력을 가지므로 치수줄기세포(dental pulp stem cells)라고도 한다⁵⁾. Gronthos 등⁶⁾은 배양된 치수 세포가 자가 재생 능력(self-renewal capacity)과 다양한 조직으로의 분화 능력(multi-lineage differentiation capacity), 그리고 클론 형성 효율(clonogenic efficiency)을 가져 치수세포가 줄기세포와 같은 성질을 가지고 있음을 밝힌바 있다.

Gronthos 등⁷⁾은 치수줄기세포와 조골세포의 전구세포로 알려진 사람 골수 기질 세포(human bone marrow stro-

*Corresponding Author: **Gi-Woon Choi**
Department of Conservative Dentistry, Division of Dentistry, Graduate of Kyung Hee University
1, Hoegi Dong, Dongdaemun Gu, Seoul, Korea, 130-702
Tel : 82-2-958-9336
E-mail : gwchoi@khu.ac.kr

mal cells)의 클론 형성 능력과 증식 능력을 비교하였으며, 치수줄기 세포를 쥐에 이식하여 치수유사(pulp-like) 조직이 상아모세포유사(odontoblast-like) 조직으로 둘러싸인 상아질 유사구조(dentin-like structure)를 형성하였다.

Miura 등⁸⁾은 유치에서 배양한 줄기 세포가 신경세포, 지방세포 및 상아모세포로 분화할 수 있는 능력이 있음을 밝혀, 자가 줄기 세포 이식 및 조직 재생술을 포함한 줄기세포 치료에 효율적으로 이용될 수 있는 독특한 자원이 될 가능성을 시사한 바 있다.

정상적인 기능을 하는 치주인대 세포는 새로운 세포의 형성 및 세포의 자연사를 반복하면서 치주조직의 항상성(homeostasis)을 유지한다. 치주인대 전구세포(progenitor cell)는 혈관주위와 골막내에 풍부하게 분포하며, 유사 분열 후에 치근주위의 치주인대 조직에서 세포의 형성과 분화가 발생한다⁹⁾.

Seo 등은 사람 치주인대에서 얻은 치주인대 줄기세포(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)가 백악모세포-유사세포, 지방세포, 교원질-형성세포로 분화하는 것을 밝혀, 치주인대 줄기세포가 백악질 및 치주인대를 재생하는 능력이 있을 가능성을 제시하였다.

Pääkkönen 등¹¹⁾은 건강한 치수와 충치에 이환된 치수 사이에서 발현되는 유전자와 단백질의 차이를 분석한 cDNA microarray assay를 통하여 두 가지 조직에서 현저하게 발현되거나 충치에 이환된 치수에서 뚜렷하게 증가되는 유전자를 밝혔다.

cDNA microarray assay를 이용한 많은 연구가 치아와 골수세포의 비교연구¹²⁾, 건강한 치수와 염증성 치수조직에서 섬유모세포의 비교연구¹³⁾, 조골세포와 조혈모 세포의 유전자 발현 비교 연구¹⁴⁾ 등에서 행해진 바 있다.

Nair¹⁵⁾는 치근첨 부위의 치수조직과 치주인대 조직에서 미생물들과 숙주방어 작용에 의하여 국소적인 치근단 염증과 치근흡수, 그리고 인접 치근단 조직의 파괴를 가져오며, 근관 충전으로 인하여 치근단 재감염을 방지한다는 것을 언급하였다.

치수와 치주인대 부착은 각기 독립된 조직이 아니라 구강 내 치아의 주요 기능을 가능하게 하는 중요한 인자이며 서로 치근첨에서 연결되어 있는 구조를 가지고 있으므로, 치아의 병변을 치료 시 치수 및 치주조직의 치료가 결합된 과정이 필요하다는 사례보고가 다수 발표되었다¹⁶⁾.

Satchell 등¹⁷⁾은 치수와 치근단 조직의 병적인 변화에 있어서 자연사의 역할을 소개하여 근관치료 시 새로운 접근방법의 가능성을 제시한 바 있다.

cDNA microarray에는 nylon filter, glass slide와 oligonucleotide silicon chip을 이용하는 다양한 방법이 있다¹²⁾. 본 실험에서는 이 중에서 oligonucleotide silicon chip을 이용하는 방법을 사용하였다. 이 실험 방법으로는

두 개의 세포 사이의 수천개의 유전자의 발현 정도를 비교하여 세포주기(cell cycle), 세포의 성장과 유지(cell growth and maintenance), 면역 반응(immune response), 외부자극에 대한 반응(response to stress), 신호전달(signal-transduction), 전사(transcription), 세포의 자연사(apoptosis)에 관련된 유전자의 발현 차이를 밝혀낼 수 있다¹⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 cDNA microarray를 통하여 치아의 치수조직 및 치주인대 조직으로부터 배양한 치수세포 및 치주인대 세포의 mRNA의 발현 차이를 얻을 수 있었으며 이를 RT-PCR로 검증함으로써 두 세포사이의 유전자의 발현정도의 차이를 규명하기 위하여 실험을 실시하였다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 세포 배양

치아의 선택, 치수 및 치주인대 조직의 채취 후 각각의 세포 배양은 다음과 같이 시행하였다. 경희대학교 부속치과병원 구강악안면외과에서 2005년 3월에 내원한 성인의 발치한 제 3대구치 중 건전한 치아를 선택하였다. 멸균상태의 작업장에서 수술용 15번 blade를 이용하여 치근 표면을 긁어 치주인대 조직을 채취하였다. 그 후 치아 표면을 깨끗이 세척한 후 멸균처리 된 치과용 tapered fissure bur(#701)를 이용하여 치수조직이 노출되기 직전까지 치아를 치아 장축에 수직으로 삭제한 후 실험실로 옮겼다. 멸균상태의 작업장에서 드라이버를 이용하여 치아를 수직으로 2등분시켜 치수조직을 노출 후 채취하였다. 채취한 치수 조직과 치주인대 조직은 6 well plate에 넣은 후 10% fetal bovine serum과 항생제(100U/mL penicillin-G, 100μg/mL streptomycin, 0.25g/mL fungizone)(Gemini Bio-Products, Inc., Woodland, CA)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Gibco, USA; DMEM)으로 5% CO₂가 공급되는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양판 바닥에 세포를 부착시켜 치수세포 및 치주인대세포가 배양 용기 바닥으로 이주하도록 기다렸으며, 배양된 치수세포 및 치주인대세포는 1:2 비율로 계대 배양시켰고 5대까지 계대 배양시킨 후 그 세포들을 본 실험에 이용하였다.

2. RNA 분리 및 정제

각각 배양된 치수세포 및 치주인대세포를 cell scraper(Fisher Scientific, Tustin, CA, USA)로 수확하였으며 각각의 세포에서 얻어진 20μg의 total RNA는 RNeasy Mini kit (Qiagen, LRS Laboratories, Inc.)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 정제하였다.

3. cDNA Microarray

치수세포와 치주인대세포의 mRNA 표본은 2회에 나누어 채취하였으며 cDNA array hybridization을 2회 시행하였다. Microarray analysis를 위하여 aminoallyl-dUTP가 있는 상태에서 총 RNA의 역전사를 수확하여 형광물질인 Cyanine 3-dCTP 혹은 Cyanine 5-dCTP로 표지된 Fluorescent- labeled cDNA를 합성하였다. 표지된 RNA 20 μ g을 제조자의 지시대로 처리하여 이용되었다. 치아에서 채취된 치수로부터 얻은 세포는 Cy3-dCTP로, 치주인대로부터 얻은 세포는 Cy5-dCTP로 표지한 cDNA를 제작하였다. cDNA microarray는 이 두 가지 표지된 cDNA를 8170개의 유전자로 점적된 Twincip human-8K (Digital genomics Inc., Seoul, Korea; <http://www.digital-genomics.co.kr/KoreanPage/product/DNAchip.htm>)에 hybridization한 후 세척하였다.

슬라이드를 건조시킨 후 Scanarray lite(Parkard Bioscience, Boston, MA)를 이용하여 DNA chip을 스캔하였고(Figure 1) GenePix software(Axon Instrument, Union City, CA)를 이용하여 분석하여 유전자 발현 비를 얻을 수 있었다. 이 값을 로그화하게 되면 LOWESS 회귀 분석에 의하여 표준화가 시행되어 보정된 값을 얻을 수 있었다.

이때 나타나는 신호가 2배 이상 차이가 나는 것을 유의성 있는 차이가 나는 것으로 분석하였다^{13,19)}.

4. RT-PCR analysis

치수세포와 치주인대 세포에서 2배 이상 발현의 차이를 보이는 유전자중 대표적인 유전자 3개씩 선택하여 RT-PCR(reverse transcription- polymerase chain reaction)을 위한 primer를 제작하였다(Table 1).

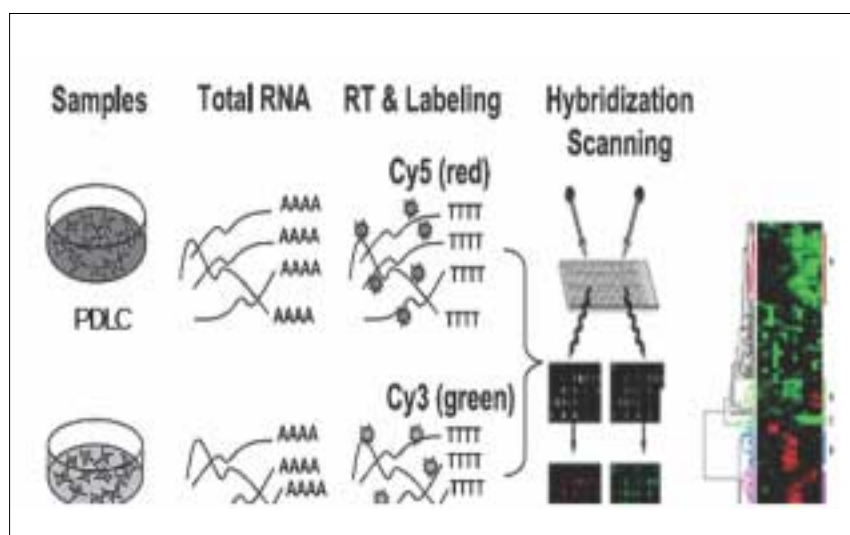


Figure 1. Overview of DNA microarray methodology

Table 1. Primers for RT-PCR

Genes	Target size	Primer sequence
Lumican (LUM)	196 bp	5' -TGATCTGCAGTGGCTCATTC-3' 3' -AAAAGAGCCCAGCTTTGTGA-5'
WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1)	163 bp	5' -TTCCTGTTGATGGGAAAAGC-3' 3' -CAAGCAGGACAAGGGAGAAG-5'
Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1)	234 bp	5' -ATGCTGAAACCCTGAAGGTG-3' 3' -CTGCTTGACCCTCAGAGACC-5'
Integrin, alpha 4 (ITGA4)	244 bp	5' -GAGTGCAATGCAGACCTTGA-3' 3' -TGGATTTGGCTCTGGAAC-5'
Neurofilament, heavy polypeptide (NEFH)	221 bp	5' -CTCCAGCTGAGGTCAAGTCC-3' 3' -CTTTGCTTCCTCCTTCGTTG-5'
Transforming growth factor-beta 2 (TGF β 2)	222 bp	5' -CCGAGGTGATTTCCATCTA-3' 3' -CTCCATTGCTGAGACGTCAA-5'

cDNA의 합성 및 RT-PCR에 의한 증폭은 AccuPower® RT/PCR PreMix(Bioneer Inc., Daejeon, Korea; http://www.bioneer.co.kr/product/product_sub.jsp?pclassCode=1)를 사용하였다. 열순환 방법은 pre-denature(94°C에서 5분간), 94°C에서 45초, 51°C에서 30초, 72°C에서 60초간 35 cycle 시행하였으며, final incubation step(72°C 10분간) 1 cycle동안 증폭시켰다. Maker와 sample을 각각 20씩 loading한 후 band intensity를 비교하였다.

III. 결 과

1. cDNA Microarray assay

Microarray image에서 붉은색으로 나타난 것은 표지된 치주인대세포에서 치수세포보다 많이 발현된 유전자이고, 녹색은 치수세포에서 치주인대 세포보다 많이 발현된 유전자이며, 또한 노란색은 치수세포와 치주인대세포에서 비슷하게 발현되는 유전자를 나타내었다(Figure 2).

TwinChip Human-8K를 이용하여 비교한 결과, 8170개의 유전자 중 대부분(99%)의 transcription level은 치수세포와 치주인대세포사이에서 2배 이하의 차이를 보였다(Figure 3).

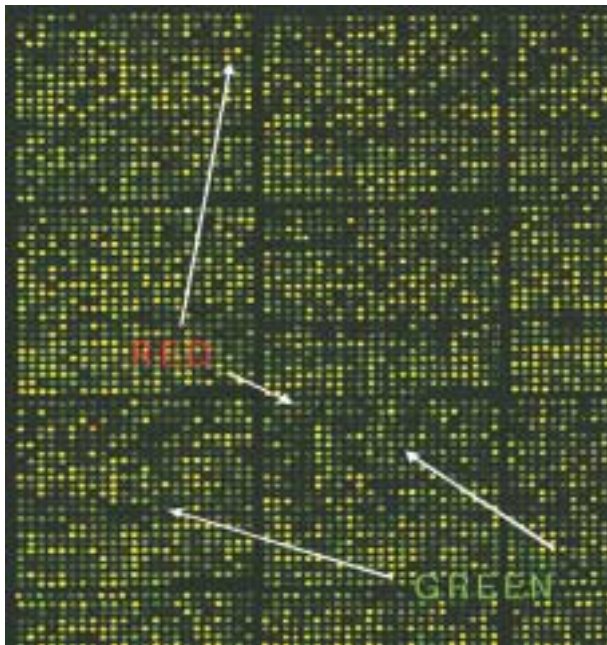


Figure 2. Microarray Scanning Image

또한 전체 유전자 중에서 1%(70 유전자)만이 2배 이상의 차이를 보였으며, Table 2는 치수세포가 치주인대 세포보다 2배 이상 발현된 51개의 유전자를 보여주며, Table 3은 치주인대 세포가 치수세포보다 2배 이상 발현된 19개의 유전자를 나타내었다.

Ratio는 Cy5를 Cy3로 나눈 값을 로그 2를 밑으로 계산한 값으로 그 값이 -1이하이면 치주인대세포보다 치수세포에서 2배 많이 발현된 유전자이고(Table 2), 1이상이면 치수세포보다 치주인대에서 2배 많이 발현된 유전자이다(Table 3).

Microarray의 수치화된 결과는 실험 간의 variation을 줄이기 위하여 표준화하였으며 표준화 수행 결과를 MA scatter plot(Figure 3)으로 나타낼 수 있다. 이는 signal intensity와 log ratio를 나타내며 가로축(A값)은 spot이 갖는 신호의 intensity의 정도를 나타내고, 세로축(M값)은 발현된 유전자 차이로 +값은 치주인대세포에서 많이 발현된 유전자이며 -값은 치수세포에서 많이 발현된 유전자를 나타내었다.

일반적으로 A 값이 큰 경우에 그 data는 더 정확한 값으로 생각할 수 있다. 이번 실험의 결과 A값이 큰 부위에서 두 가지 종류의 세포에서 유전자 발현의 차이를 나타내었다.

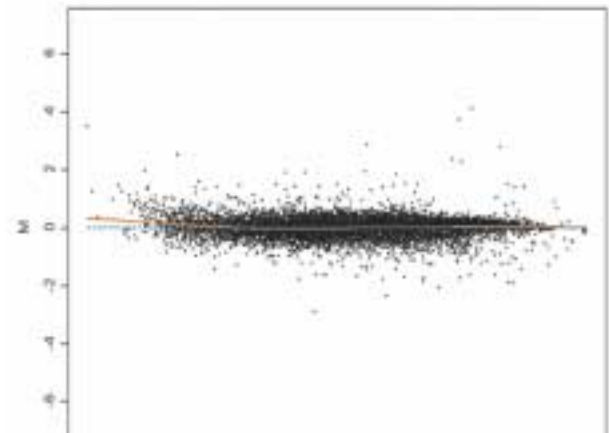


Figure 3. M-A plot

The log ratios($M = \log_2 R/G$) are plotted on the y-axis against the log of the geometric mean of the signal intensities ($A = \log_2 (R \times G/2)$). M, expression ratio; A, signal intensity; R, Red for Cy5; G, Green for Cy3.

Table 2. The genes expressed more than two fold from the cells cultured with PC than PDLRatio = \log_2 Cy5/Cy3 (Cy5: PDL, Cy3: PC)

Name	ratio	Title	Biological_Process
PVRL3	-1.84	Poliovirus receptor-related 3	—
NPC1	-1.58	Niemann-Pick disease, type C1	cholesterol transport;intracellular protein transport
NEDD4	-1.51	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	ubiquitin cycle
ZNF167	-1.1	Zinc finger protein 167	regulation of transcription, DNA-dependent
ZNF184	-1.33	Zinc finger protein 184 (Kruppel-like)	—
SCG2	-1.22	Secretogranin II (chromogranin C)	protein secretion
ZNF443	-1.39	Zinc finger protein 443	induction of apoptosis;regulation of transcription, DNA-dependent;response to stress
MEIS4	-1.02	Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 4 (mouse)	—
DOC1	-2.14	Downregulated in ovarian cancer 1	biological_process unknown
—	-1.15	—	—
ITGA2	-1.42	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	blood coagulation;cell-matrix adhesion;integrin-mediated signaling pathway;organogenesis
DCBLD2	-1.46	Discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	cell adhesion
MMP11	-1.1	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	collagen catabolism;morphogenesis
—	-1.35	Similar to Zinc finger protein 20 (Zinc finger protein KOX13) (DKFZp572P0920)	—
NMT2	-1.43	N-myristoyltransferase 2	N-terminal protein myristoylation;protein-lipoylation
PITRM1	-1.17	Pitrilysin metalloproteinase 1	—
PDE1C	-1.02	Phosphodiesterase 1C, calmodulin-dependent 70kDa	signal transduction
ZNF272	-1.12	Zinc finger protein 272	regulation of transcription, DNA-dependent
ALDH1A3	-1.22	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	alcohol metabolism;lipid metabolism;metabolism
ZNF184	-1.17	Zinc finger protein 184 (Kruppel-like)	—
ZNF230	-1.38	Zinc finger protein 230	regulation of transcription, DNA-dependent
LRRN3	-1.42	Leucine rich repeat neuronal 3	—
PRG1	-1.07	Proteoglycan 1, secretory granule	—
ZNF307	-1.02	Zinc finger protein 307	regulation of transcription, DNA-dependent
DOC1	-1.78	Downregulated in ovarian cancer 1	biological_process unknown
PLOD2	-1.09	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2	protein metabolism;protein modification
ZNF197	-1.1	Zinc finger protein 197	regulation of transcription, DNA-dependent
IL6ST	-1.32	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	cell surface receptor linked signal transduction; immune response
ZNF175	-1.16	Zinc finger protein 175	regulation of transcription, DNA-dependent

NEFH	-1.37	Neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	neurogenesis:nucleosome assembly
MBL1P1	-1.3	Mannose-binding lectin (protein A) 1, pseudogene 1	—
ZNF195	-1.37	Zinc finger protein 195	regulation of transcription, DNA-dependent
SCN9A	-1.36	Sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	cation transport:sodium ion transport
ZNF84	-1.01	Zinc finger protein 84 (HPF2)	regulation of transcription, DNA-dependent
C6	-1.09	Complement component 6	complement activation, classical pathway: cytolysis:response to pathogenic bacteria
SLIT2	-1.04	Slit homolog 2 (Drosophila)	cell adhesion:chemotaxis:glia cell migration: induction of negative chemotaxis:induction of negative chemotaxis
ZNF165	-1.02	Zinc finger protein 165	regulation of transcription, DNA-dependent
ITGA4	-2.06	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	cell-matrix adhesion:integrin-mediated signaling pathway
MYLK	-1.24	Myosin, light polypeptide kinase	protein amino acid phosphorylation: protein amino acid phosphorylation
TGFB1	-1.16	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	cell adhesion:cell proliferation: negative regulation of cell adhesion:visual perception
MT1F	-1.29	Metallothionein 1F (functional)	biological_process unknown
PLA2G1B	-1.3	Phospholipase A2, group IB (pancreas)	actin filament organization:lipid catabolism: signal transduction
DUSP6	-1.01	Dual specificity phosphatase 6	inactivation of MAPK:protein amino acid dephosphorylation: regulation of cell cycle
MT1X	-1.01	Metallothionein 1X	response to metal ion
CYR61	-1.14	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	cell adhesion:cell proliferation:chemotaxis:morphogenesis: regulation of cell growth
—	-1.05	—	—
SERPINE1	-1.08	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	blood coagulation
BRAP	-1.07	BRCA1 associated protein	—
NT5E	-1.09	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	DNA metabolism:nucleotide catabolism
CTGF	-1.18	Connective tissue growth factor	DNA metabolism:cell adhesion:cell growth and/or maintenance:cell motility:epidermis development:regulation of cell growth
MRE11A	-1.04	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	double-strand break repair via nonhomologous end-joining:meiosis:meiotic recombination:regulation of mitotic recombination:telomerase-dependent telo

Table 3. The genes expressed more than two fold from the cells cultured with PDLC than PCRatio = \log_2 Cy5/Cy3 (Cy5: PDLC, Cy3: PC)

name	ratio	Title	Biological Process
LEPR	1.43	Leptin receptor	—
—	1.36	—	—
—	1.21	Transcribed locus	—
LUM	2.24	Lumican	collagen fibril organization
—	1.21	—	—
CXCL12	2.01	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	G-protein coupled receptor protein signaling pathway, calcium ion homeostasis, cell adhesion, cell-cell signaling
WISP1	1.87	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	Wnt receptor signaling pathway; cell adhesion; cell growth and/or maintenance; cell-cell signaling; regulation of cell growth; signal transduction
NET1	1.21	Neuroepithelial cell transforming gene 1	—
MTSS1	1.08	Metastasis suppressor 1	actin cytoskeleton organization and biogenesis; cell adhesion; cell motility; microspike biogenesis; muscle development
—	1.01	—	—
ENPP1	1.15	Ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase 1	energy pathways; nucleotide metabolism; phosphate metabolism; response to nutrients
CPE	1.31	Carboxypeptidase E	metabolism; neuropeptide signaling pathway; protein modification; proteolysis and peptidolysis
MMP10	1.14	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	collagen catabolism
AKR1C1	1.27	Aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	xenobiotic metabolism
RREB1	1.07	Ras responsive element binding protein 1	Ras protein signal transduction; development; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription from Pol II promoter
MMP1	2.09	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	collagen catabolism
ABCG2	1.62	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	response to drug; transport
PRKACA	1.81	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	protein amino acid phosphorylation
IGFBP5	1.04	Insulin-like growth factor binding protein 5	cell growth and/or maintenance; regulation of cell growth; signal transduction

2. RT-PCR analysis

Microarray analysis의 결과를 확증하기 위해 치수세포와 치주인대 세포에서 2배 이상 발현의 차이를 보이는 유전자 중 Integrin alpha (ITGA) 4, Transforming growth factor (TGF)-beta에 대한 mRNA level을 RT-PCR을 통하여 분석한 결과 치주 인대 세포에서 보다 치수 세포에서 높게 나타났으나, Neurofilament heavy polypeptide (NEFH)는 치수세포와 치주인대 세포에서 유사한 양상을 나타내었다(Figure 4). 또한 치주인대 세포에서 치수세포보다 2배 이상 나타나는 대표적인 3개의 유전자 Matrix metalloproteinase(MMP)-1, WNT1 inducible signaling pathway protein (WISP)-1, Lumican (LUM)에 대한 mRNA level을 RT-PCR을 통해 분석한 결과 치수 세포에서보다 치주 인대 세포에서 높게 나타나 microarray assay와 동일한 결과를 나타냈다(Figure 5).

IV. 총괄 및 고안

치수조직과 치주인대의 구성성분과 결합조직의 구조는 서로 뚜렷한 차이를 보이나 치근침의 법랑-백악질 경계부위(cemento-enamel junction)에서 서로 연결되어 있는 결합조직이다. 치수조직과 치주인대 조직의 기질 성분은 서로 인접한 구조의 세포 활성화에도 영향을 미치는 것으로 밝혀졌지만 치수세포와 치주인대 세포 사이의 독특한 상호작용의 분자적 특성과 그것들의 유전자 발현에 대한 정보는 거의 없다. 치수세포와 치주인대 세포의 유전자 발현의 차이를 밝히기 위하여 microarray assay를 이용한 연구는 매우

흥미로운 접근방법이라고 생각된다.

Cy3로 표지한 치수세포로부터 cDNA를 제작하였고, Cy5로 표지한 치주인대 세포로부터 제작된 cDNA Probe를 8170개 유전자의 microarray로 hybridization시켰다. 치수세포와 치주인대 세포로부터 분리된 mRNA를 이용한 microarray 방법으로 분석한 결과 두 조직 간에 유전자 발현에서 상당한 차이를 보였다.

본 연구에서는 치수세포와 치주인대 세포의 유전자 발현 유형사이의 차이를 분석하기 위해 유전자 microarray 방법을 이용하였다. 치아의 치수 및 치주인대 조직으로부터 일차 배양한(primary cell culture) 치수세포 및 치주인대세포에서 발현되는 유전자의 차이를 알아보고자 Twinchip human-8K를 이용하여 cDNA microarray를 시행하였다. 이 방법을 시행하면 두 세포사이의 여러 가지 다른 유전자의 발현정도의 차이를 비교분석할 수 있다.

Satchell 등¹⁷⁾은 apoptosis에 대한 보고에서 치수의 apoptosis는 상아모세포층 하방에서 주로 발견되고 치아에 손상 시 상아모세포 수가 현저히 감소하면서 reparative dentin(3차 상아질)을 형성하는데 관여하며, 치주인대의 항상성을 유지하는데 필수적이라고 보고하였다.

치수세포와 치주인대 세포로부터 만든 cell line을 이용한 실험²⁰⁾에서 치수세포는 dentin sialophosphoprotein (DSPP)이 발현되는 반면, 치주인대 세포는 alkaline phosphatase, osteopontin, 그리고 osteocalcin은 나타나는 반면, DSPP는 발현되지 않았다고 보고하였다.

Silva 등²¹⁾은 상아질의 광화된 기질내에는 수많은 polypeptides와 signaling molecules가 함유되어 있으며, 치수와 치주인대의 손상 시 분비되어 주위의 세포(치주세

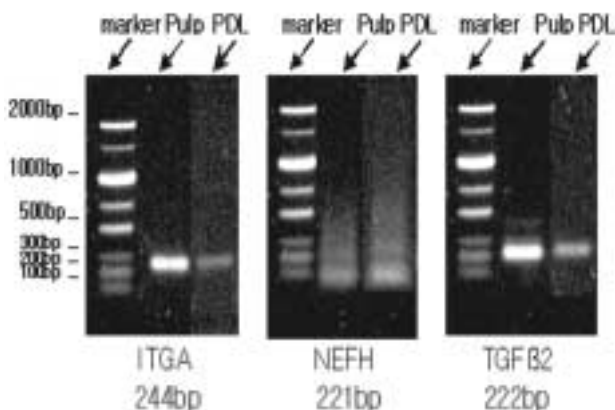


Figure 4. Confirmation of differentially expressed genes observed in microarray results. Three genes (ITGA, NEFH, TGF β 2) selected from the genes express more than two fold in pulp cells than periodontal ligament cells were analysed by RT-PCR.

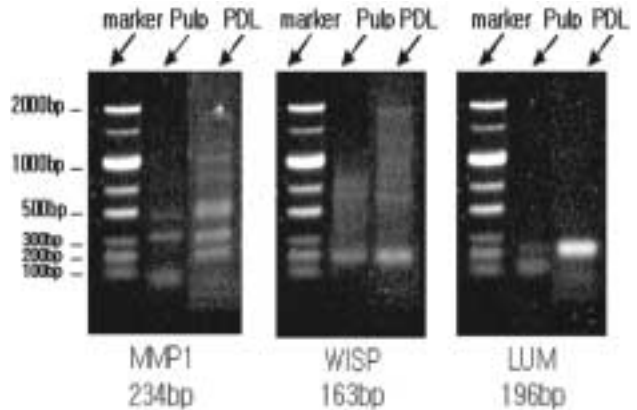


Figure 5. Confirmation of differentially expressed genes observed in microarray results. Three genes (MMP1, WISP, LUM) selected from the genes express more than two fold in periodontal ligament cells than pulp cells were analysed by RT-PCR.

포, 조골세포, 파골세포, 그리고 염증세포 등)에 작용하여 치아의 병적인 과정에 영향을 준다고 검토하여, TGF- β , BMPs, EGF, IGF, PDGF, FGF, MMP 등이 치주조직과 골조직의 형성 및 흡수에 영향을 준다고 하였다.

Microarray assay결과 치주인대세포에서 보다 치수세포에서 2배 이상 발현한 유전자 수는 총 51개였으며, 그중 Integrin alpha (ITGA) 2와 4, glycoprotein, Neurofilament heavy polypeptide (NEFH), Connective tissue growth factor, Transforming growth factor (TGF)-beta 등이 특징적으로 나타났다. 또한 치배 형성에 관여하며, 치주조직의 개조에 역할을 하는 Connective tissue growth factor가 치주인대세포의 증식과 분화에는 영향을 준다는 것은 보고된 바 있었으나²²⁾, 치주인대세포에서보다 치수세포에 영향을 준다는 것은 새로이 밝혀진 결과이다.

Integrin은 glycoprotein family로서 세포 표면 부착 수용기에 비공유결합하며, 사람 치수세포가 Integrin alpha 1, alpha 3, alpha 5, alpha 6, alpha v, 그리고 beta 1을 분비하여 생물학적 활성 분자인 laminin과 fibronectin에 부착시킨다고 밝혀진바 있다²³⁾.

Neurofilament heavy polypeptide는 신경세포에 특이적인 filament에 나타나며 신경세포의 cytoskeletal plasticity를 조절한다. 치수의 치근단 부위와 중간부위에서는 혈관을 함께 동반한 두꺼운 neurofilament nerve bundle이 우세하며, 치관측 부위, 특히 치수각 부위에서는 치수-상아질 복합체 부위에 calcitonin gene-related peptide(CGRP)와 substance P에 반응하는 신경섬유들이 분포하고 있다²⁴⁾.

TGF-beta는 유전자 전사과정을 조절하는 기능을 가지고 있어서 세포의 성장에 관여하며²⁵⁾ 세포의 성장과 분화를 조절하는 강력한 인자로 알려져 왔다²⁶⁾. 특히 TGF-beta는 뼈 형성과 치아 형성 시에 작용하는 세포의 분화에 관여하며 TGF-beta와 TGF-beta receptor가 결합하면 핵에서의 전사 과정을 기시하여 세포의 증식을 조절하는 기능을 갖게 된다²⁷⁻³⁰⁾. Toyono 등³¹⁾은 쥐와 소의 embryonic pulp와 adult pulp에서 TGF-beta receptor type I과 II, activins, 그리고 BMP (bone morphogenic protein)가 발현됨을 밝혀 치아의 성장과 치주조직의 회복 시 다양한 역할을 함을 밝힌 바 있으며, 또한 사람치아의 치수를 면역염색 시 상아모세포층에서 TGF-beta receptor I과 II가 강하게 발현되었음을 관찰하였다³²⁾. 본 연구에서는 세포의 성장을 증진시키며 경조직 형성을 촉진시키는 것으로 알려진 TGF-beta II의 발현이 치수세포에서 치주인대세포보다 강하게 나타났다.

Microarray assay의 결과를 토대로 치수세포에서 치주인대세포보다 2배 이상 발현한 유전자 중 Integrin alpha

4, Neurofilament heavy polypeptide, Transforming growth factor-beta를 선택하여 RT-PCR한 결과에서는 NEFH는 치수세포와 치주인대세포에서 차이를 보이지 않았다.

Microarray assay결과 치수세포에서 보다 치주인대세포에서 2배 이상 발현한 유전자 수는 총 19개였으며, 그중 치주인대의 항상성에 기여하는 것으로 생각되는 교원질 합성에 역할을 하는 Matrix metalloproteinase (MMP)-1, -10, Lumican (LUM) 등은 치수 세포에서보다 치주인대 세포에서 뚜렷하게 나타났으며, 이는 MMP-1과 Lumican을 선택하여 시행한 RT-PCR에서도 동일한 결과로 나타났다.

치수조직 및 상아모세포에서 MMP의 분포 및 chemokine과의 상호작용에 관한 보고가 있었으며³³⁻³⁵⁾, 치수세포보다 치주인대 세포에서의 MMP-1의 발현이 현저한 것은 이전의 연구에서 발표되지 않은 결과이다.

Small interstitial leucine-rich keratan sulphate proteoglycan인 lumican은 발치된 사람치아의 세포성 백악질의 백악아세포를 둘러싸고 있는 lacuna부위와 치주인대 섬유³⁶⁾ 및 상아질-치수 복합체의 상아세관 및 전상아질에서도 관찰되었다³⁷⁾.

Microarray assay 결과 중 치주인대세포에서 치수세포에서보다 2배 이상 발현한 유전자인 WNT1 inducible signaling pathway protein (WISP)-1을 RT-PCR한 결과도 동일하게 나타났다. 쥐의 cornea stromal cell을 primary culture한 세포의 유전자 발현을 관찰한 연구에서 myofibroblast는 WNT1 inducible signaling pathway protein (WISP)-1을 발현시킨바 있다³⁸⁾.

본 연구에서는 사람치아의 치수 및 치주인대 조직으로부터 배양한 치수세포와 치주인대 세포에서 발현되는 유전자 중 각각에 대해서 2배 이상의 증가를 발현시킨 유전자를 관찰한 결과 치수세포에서 2배 이상 증가된 발현을 나타내는 유전자가 치주인대세포에서 2배 이상 증가된 발현을 나타내는 유전자 수보다 훨씬 많이 나타났으며 그중 상아모세포에서 많이 발현된다고 밝혀진 유전자들 몇 개가 특징적으로 관찰되었다. 반면 치주인대세포에서 치수세포보다 2배 이상 많이 발현되는 유전자는 상대적으로 적은 수였으며, 그중 치주조직의 항상성을 유지하는 교원질 합성과 분해에 관여하는 특징적인 유전자 몇 개를 관찰할 수 있었다.

비록 Microarray assay method가 치수세포와 치주인대 세포에서 나타나는 유전자의 발현의 차이를 관찰할 수는 있지만, 현재는 치수와 치주인대 연구 부분에서 가치가 제한적이다. 그러나 단편적으로 두 가지 다른 종류의 세포에서 어떤 유전자가 어떤 세포에서 정확히 어떤 역할을 하는지에 대해서는 정확히 결론 내리기는 어려우며, 그것들에 대한 더욱 과학적인 검증과 연구가 행해져야 한다. 본 연구 결과

는 향후 치수 및 치주 인대의 구성 성분 및 기능과 관련된 유전자 발현과의 복잡한 관계를 이해하는데 기초가 될 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 사람 치수세포 및 치주인대세포의 차이를 알아보고자 배양한 치수세포 및 치주인대 세포를 cDNA microarray assay를 통하여 유전자의 발현정도의 차이를 비교하였으며, 그 결과를 바탕으로 각각의 세포에서 2배 이상의 유전자 발현의 차이를 보이는 유전자중 특징적인 3가지 유전자를 선택하여 RT-PCR로 검증한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다:

1. Microarray assay 결과, 치주인대 세포에 비해 치수 세포에서 2배 이상 발현한 유전자 수는 총 51개가 나타났다.
2. RT-PCR의 결과, 치주인대세포에 비해 치수 세포에서 Integrin alpha 4, Transforming growth factor-beta 등이 높게 나타났다.
3. Microarray assay 결과, 치수 세포에서 비해 치주인대 세포에서 2배 이상 발현한 유전자 수는 총 19개가 나타났다.
4. RT-PCR의 결과, 치수 세포에 비해 치주인대세포에서 Lumican, WNT1 inducible signaling pathway protein 1, Matrix metalloproteinase 1 등이 높게 나타났다.

본 연구 결과로 치수세포에는 상아질 형성에 관여하는 특징적인 유전자가 치주인대세포에 비해 높게 발현되었으며, 치주인대세포에는 교원질 합성에 관여하는 특징적인 유전자가 치수세포에 비해 높게 발현되어, 치수세포와 치주인대 세포는 유전자 발현의 차이가 나타남을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Ruch JV. Tooth morphogenesis and differentiation In: Linde A(ed). Dentin and Dentinogenesis. Boca Raton, FL: CRC press, 47-79, 1984.
2. Kikuchi H, Sawada T, and Yahnagisawa T. Effects of a functional agar surface on in vitro dentinogenesis induced in proteolytically isolated agar-coated dental papillae in rat mandibular incisors. *Arch Oral Biol* 41:871-883, 1996.
3. Ruch JV. Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *J Dent Res* 64S:489-498, 1985.
4. Osman M and Ruch JV. Behavior of odontoblast and basal lamina of trypsin or EDTA-isolated mouse dental papillae in short-term culture. *J Dent Res* 60: 1015-1027, 1981.
5. Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem cell Biol* 76: 923-938, 1998.
6. Gronthos S, Brahimi J, W Li, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, Denbesten P, Gehron Robey P, and Shi S. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res* 81(8):531-535, 2002.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, and Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 97:13625-13630, 2000.
8. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, and Shi S: SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci* 100: 5807-5812, 2003.
9. McCulloch CA. Origin and function of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis* 1(4):271-278, 1995.
10. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, and Shi S: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149-155, 2004.
11. Pääkkönen V, Ohlmeier S, Bermann U, Larmas M, Salo T, and Tjäderhane L. Analysis of gene and protein expression in healthy and carious tooth pulp with cDNA microarray and two-dimensional gel electrophoresis. *Eur J Oral Sci* 113: 369-379, 2005.
12. Shi S, Robey PG, and Gronthos S. Comparison of Human Dental Pulp and Bone Marrow Stromal Cells by cDNA Microarray Analysis. *Bone* 295: 532-539, 2001.
13. Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, and Tanaka J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 305:970-973, 2003.
14. Han X, Bolcato L, and Amar S. Identification of Genes Differentially Expressed in Cultured Human Osteoblasts Versus Human Fibroblasts by DNA Microarray Analysis. *Connect Tissue Res* 43: 63-75, 2002.
15. Nair PNR. Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Cause of Endodontic Failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 15(6): 348-381, 2004.
16. Anand PS and Nandakumar K. Management of Periodontitis Associated with Endodontically Involved Teeth: A Case Series. *J Contemp Dent Pract* 2(6):118-129, 2005.
17. Satchell PG, Gutmann JL, and Witherspoon DE. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *Int Endod J* 36: 237-245, 2003.
18. Han X and Amar S. Identification of genes differentially expressed in cultured human periodontal ligament fibroblasts vs. human gingival fibroblasts by DNA microarray analysis. *J Dent Res* 81(6):399-405, 2002.
19. Chen S, Santos L, Wu Y, Vuong R, Gay I, Schulze J, Chuang HH, and MacDougall M. Altered gene expression in human cleidocranial dysplasia dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 50:227-236, 2005.
20. Kamata N, Fujimoto R, Tomonari M, Taki M, Nagayama M, and Yasumoto S. Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. *J Oral Pathol Med* 33:417-423, 2004.
21. Silva TA, Rosa AL, and Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals

- for healing and resorption of dental and periodontal tissues. *Oral Diseases* 10:63-74, 2004.
22. Asano M, Kubota S, Nakanishi T, Nishida T, Yamaai T, Yosimich G, Ohyama K, Sugimoto T, Murayama Y, and Takigawa M. Effect of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) on proliferation and differentiation of mouse periodontal ligament-derived cells. *Cell Commun Signal* 5:3-11, 2005.
23. Zhu Q, Safavi KE, and Spanberg LS. Intergin expression in human dental pulp cells and their role in cell attachment on extracellular matrix proteins. *J Endod* 24(10):641-644, 1998.
24. Luthman J, Luthman D, and Hokfelt T. Occurrence and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp. *Arch Oral Biol* 37(3):193-208, 1992.
25. Beck LS. In vivo induction of bone by recombinant human transforming growth factor beta 1. *J Bone Miner Res* 6:961-968, 1991.
26. Machwate M, Julienne A, and Moukhtar M. Temporal variation of c-fos proto-oncogene expression during osteoblast differentiation and osteogenesis in developing rat bone. *J Cell Biochem* 57:62-70, 1995.
27. Centrella M, McCarthy TL, and Canalis E. Transforming growth factor beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am* 73A:1418-1428, 1991.
28. Ingram RT, Bonde SK, Riggs BL, and Fitzpatrick LA. Effects of transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the function, cytochemistry and morphology of normal human osteoblast-like cells. *Differentiation* 55:153-163, 1994.
29. Ripamonti U, Duneas N, Van den Heever B, Bosch C, and Crooks J. Recombinant transforming growth factor beta induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1(bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner Res* 12:1584-1595, 1997.
30. Rosen D, Miller SC, DeLeon E, Thompson AY, Bentz H, Mathews M, and Adams S. Systemic administration of recombinant transforming growth factor beta 2 stimulates parameters of cancellous bone formation in juvenile and adult rats. *Bone* 15:355-359, 1994.
31. Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, and Akamine A. Expression of TGF-beta superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res* 76:1555-60, 1997.
32. Sloan AJ, Matthews JB, and Smith AJ. TGF-beta receptor expression in human odontoblasts and pulp cells. *Histochem J* 31:565-569, 1999.
33. Gusman H, Santana RB, and Zehnder M. Matrix metalloproteinase and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 110(5):353-357, 2003.
34. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, and Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinase in pulps and periapical lesions. *J Endod* 28(4):313-315, 2002.
35. Lin SK, Wang CC, Huang S, Lee JJ, Chiang CP, Lan WH, and Hong CY. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod* 27(3):185-189, 2001.
36. Ababneh KT, Hall RC, and Embery G. The proteoglycans of human cementum : immunohistochemical localization in healthy, periodontally involved and ageing teeth. *J Periodontal Res* 34(2): 87-96, 1999.
37. Hall RC, Embery G, and Lloyd D. Immunochemical localization of the small leucin-rich proteoglycan lumican in human predentin and dentin. *Arch Oral Biol* 42(10-11):783-786, 1997.
38. Chakravarti S, Wu F, Vij N, Roberts L, and Joyce S. Microarray studies reveal macrophage-like function of stromal keratocytes in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(10): 3475-3484, 2004.

국문초록

사람 치수 세포와 치주 인대 세포의 유전자 발현에 관한 비교 연구

소 현 · 박상혁 · 최기운*

경희대학교 대학원 치의학과 치과보존학교실

본 연구는 사람 치수세포 및 치주인대세포의 차이를 알아보기 위하여 배양한 각각의 세포를 cDNA microarray assay를 통하여 유전자의 발현정도의 차이를 비교하였다. 그 결과를 바탕으로 각각의 세포에서 2배 이상의 유전자 발현의 차이를 보이는 유전자중 특징적인 3가지 유전자를 선택하여 RT-PCR로 검증한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다:

1. Microarray assay 결과, 치주인대 세포에 비해 치수 세포에서 2배 이상 발현한 유전자 수는 총 51개가 나타났다.
2. RT-PCR의 결과, 치주인대세포에 비해 치수 세포에서 ITGA4, TGF- β 2 등이 높게 나타났다.
3. Microarray assay 결과, 치수 세포에서 비해 치주인대 세포에서 2배 이상 발현한 유전자 수는 총 19개가 나타났다.
4. RT-PCR의 결과, 치수 세포에 비해 치주인대세포에서 LUM, WISP1, MMP1 등이 높게 나타났다.

본 연구 결과로 치수세포에는 상아질 형성에 관여하는 특징적인 유전자가 치주인대세포에 비해 높게 발현되었으며, 치주인대세포에는 교원질 합성에 관여하는 특징적인 유전자가 치수세포에 비해 높게 발현되어, 치수세포와 치주인대 세포는 유전자 발현의 차이가 나타남을 알 수 있었다.

주요단어 : cDNA microarray assay, 치수세포, 치주인대세포, RT-PCR, 상아질형성, 교원질 합성