

사람 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에서 Periostin과 S100A2-, S100A4-칼슘결합단백 mRNA의 발현

김병옥¹⁺ · 한경윤¹⁺ · 최용선¹ · 김세훈¹ · 박병기¹ · 김흥중²⁺ · 박주철^{3,*,+}

조선대학교 치과대학 치주과학교실¹, 조선대학교 치과대학 구강해부학교실²

조선대학교 치과대학 구강조직학교실³, 조선대학교 구강생물학 연구소⁺

I. 서론

치주조직은 다양한 경조직과 연조직으로 구성된 고도로 분화된 기관이다. 연조직은 치은과 치주인대로 이루어져 있는데, 치은은 치아의 지지와 저작과정에 관여하는 단순 결합조직인 반면에 치주인대는 치아와 치조골 사이에 위치하여 치아를 악골에 부착 지지하며, 저작력과 같은 다양한 방향의 기계적 스트레스에 저항하고, 감각기능을 하는 고도로 분화된 세포성 결합조직이다¹⁾. 세포의 구성을 보면 치은은 간엽조직 기원의 섬유모세포, 대식세포, 미분화 간엽세포 및 혈관 세포 등이 분포하고 있는 반면에 치주인대는 이들 세포 이외에도 서로 다른 표현형을 나타내는 외배엽성 간엽 기원의 골모세포, 파골세포, Malassez 상피세포잔사, 미분화간엽세포 및 백악모세포 등의 다양한 세포들로 이루어져 있다²⁻⁴⁾. 그 중에서 특히, 섬유모세포는 치은과 치주인대에 공통적으로 존재하는 세포 성분이지만 그 기원이 각각 간엽과 외배엽성 간엽으로 구분되고, 기능적으로는 치은섬유모세포는 단순히 치은 결합조직의 합성하고 유지하는 역할을 하는 반면에 치주인대 섬유모세포는 형태학적으로 구분 할 수 없는 다양한 세포 집단을 포함하고 있기 때문에 치주인대의 형성과 유지

뿐만 아니라 인접 치조골과 백악질의 치유와 개조에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 그 서로 다른 특성에 관하여 관심이 높아지고 있다^{5,6)}.

치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 특성에 관한 연구에서, Giannpoulou와 Cimasoni⁷⁾는 세포배양 후 위상차현미경 및 주사전자현미경 관찰에서 치은섬유모세포와 치주인대 섬유모세포 모두 방추형의 전형적인 섬유모세포양 세포의 형태를 나타낸다고 하였으나, Hou와 Yaeger⁸⁾는 치주인대섬유모세포에는 다양한 형태의 서로 다른 세포들이 존재한다고 하였다. 치은섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 기능적 차이에 관하여는 Boyko^등⁵⁾ 이 동물실험에서 두 종류의 세포들을 각각 치근 위에서 배양하여 생체에 이식하였을 때, 치주인대 섬유모세포는 전구세포로 작용하여 새로운 치주인대 결합조직을 형성한 반면에, 치은섬유모세포는 새로운 조직을 형성하지 않는다고 하였다. 또한, 임상적으로도 치주질환의 치료시 치주인대 섬유모세포를 치근위에 재위치 시킬 경우 교원질 섬유소의 형성과 함께 새로운 백악질등에 의해 치주조직이 재생되나, 치은결합조직에서 유래한 세포를 이용하면 치주조직이 재생되지 않는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 치은섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 분자특성에 관한 연구들을 살

* 이 논문은 1999년도 조선대학교 학술연구비 지원을 받아 연구되었음

교신저자: 박주철 광주광역시 동구 서석동 421번지, 조선대학교 치과대학 구강조직학교실 jcpark@mail.chosun.ac.kr, 230-6874

해보면 치은섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포가 총 단백질과 교원질의 합성능, 부갑상선호르몬에 대한 반응으로 나타나는 5'-cyclic AMP의 합성 및 prostaglandin E2의 생산력이 높으며, 성장인자, 세포외기질 단백질 및 부착인자에 대한 반응성은 두 세포가 차이점을 나타내는 것으로 알려져 있다⁷⁻¹³⁾. 또한, 치주인대세포는 osteonectin, bone-gla-protein의 생산, 높은 알칼리성 인산분해효소의 활성 및 세포배양시 석회화 결절의 형성조건 등과 같은 골모세포와 유사한 특성도 나타내는 것으로 보고되고 있다⁴⁾.

최근에 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 특성 비교에 관한 분자생물학적 연구에서 Duarte 등¹⁵⁾은 S100 칼슘결합단백계(S100 calcium-binding protein family)의 일종인 S100A4와 S100A2가 소의 치주조직의 *in-situ* hybridization 연구에서 확인되고, 치주인대세포의 배양액에서 검출되며, 골수기원의 골모세포를 배양할 때 투여하면 골모세포에 의한 석회화 결절의 합성을 농도 의존적으로 억제한다고 하여, 이 단백질이 석회화 없이 치주인대의 폭경을 정상적으로 유지하는데 중요한 역할을 함을 시사하였다. 또한, Horiuchi 등¹⁶⁾은 MC3T3E1 세포주에서 골모세포 특이 유전자인 OSF-2를 동정하여 그 특이적 발현을 치주인대와 골막에서 확인하고 그 단백질을 periostin이라 명명하였다.

본 연구는 사람의 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포를 배양하여 배양 섬유모세포들에서 S100A4와 S100A2 칼슘결합단백계(S100 calcium-binding protein family)와 periostin(OSF2)의 발현을 RT-PCR과 Northern 분석을 이용하여 확인한 연구로써, 사람 배양섬유모세포에서 각 각의 유전자 발현의 차이를 규명함은 물론 이 결과를 치주인대 섬유모세포 분화와 관련한 특이 유전자의 동정에 응용 하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 사람 치은 섬유모세포 및 치주인대 섬유모세포의 배양

00대학교 치과대학 부속 치과병원에 내원한 치주

조직이 건강한 사람의 제3대구치 부위의 정상치은과 제3대구치의 치근 중간 1/3에서 얻은 조직들을 무균 작업대에서 항생제가 함유된 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS, Gibco BRL, Grand Island, NY)으로 수회 세척한 후 해부현미경하에서 1-2mm의 크기로 절단하였다. 절단된 조직 단편들을 60mm 세포배양기(Falcon, Roskilde, Denmark)에 위치시킨 후 조직의 이동을 방지하기 위하여 슬라이드 글라스를 조직 위에 올려놓고 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY)을 이용하여 5% CO₂, 37℃, 100% humidity 조건에서 배양하였다. 배지는 이틀에 한번씩 교체하고 세포가 증식함에 따라 계대 배양하여 3세대의 세포들을 실험에 이용하였다.

2. 배양세포로부터 total RNA와 poly(A)+RNA의 추출

배양된 세포로부터 total RNA의 추출은 SV total RNA Isolation System(Promega, Madison, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였으며, total RNA의 양은 spectrophotometer(Amersham, Amersham, UK)를 이용하여 260nm와 280nm의 파장에서 측정하였고 일부의 total RNA는 oligo(dT)-latex(Invitrogen)를 이용하여 poly(A)⁺ RNA를 추출하여 실험에 사용하였다.

3. Reverse transcription(RT)-PCR과 sequence analysis

배양 치주인대 섬유모세포와 치은섬유모세포의 total RNA 및 poly(A)⁺ RNA 1μg 당 25 U의 AMV reverse transcriptase(Promega, Madison, USA)와 oligo-d(T) primer를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 사람 Calcium binding protein-S100A4, calcium binding protein-S100A2, periostin(OSF-2, osteoblast-specific factor 2) 및 G3PDH의 유전자의 염기서열을 blast search program(NIH)을 이용하여 얻고 이에 부합하는 sense와 antisense oligonu-

Table 1, Oligonucleotide primers used in the PCR amplification of human S100A4, S100A2, periostin, and G3PDH.

| Gene(expected size) | Primer sequence |
|---------------------|--|
| Periostin(548bp) | 5' primer 5'-AAACTCCTCTATCCAGCAGA-3' 3' primer 3'-AGCAGTCTTTTAATTTCTTC-3' |
| S100A2 (278bp) | 5' primer 5'-AAGAGGGCGACAAGTTCAAGC-3' 3' primer 5'-GAATGTTGCAGGAAACAGCCA-3' |
| S100A4 (295bp) | 5' primer 5'-CTCAGCGCTTCTTCTTCTT-3' 3' primer 5'-ATCATGGCGATGCAGGACA-3' |
| G3PDH (458bp) | 5' primer 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAG-3' 3' primer 5'-TCCACCACCCCTGTTGCTGTA-3' |

cleotide primer를 주문 제작하였다(Table, 1).

Reverse transcription(RT)과정을 통하여 합성한 cDNA를 template로 각 각의 primer를 이용하여 94℃: 4 min, 36 cycle(94℃: 1 min, 55℃: 30 sec, 72℃: 2 min), 72℃: 5 min의 조건으로 PCR 증폭(PCR cyler, MJ research)을 시행한 후 1.5% agarose gel에 전기영동하여 유전자의 발현을 확인하였다.

분리된 유전자단편들을 T/A cloning vector(Invitrogen)을 이용하여 subcloning하고ABI automatic sequencer(Perkin-Elmer, Foster city, CA, USA)를 이용하여 sequencing한 후 sequence tag를 만들어 blast search program(NIH)을 이용하여 database상의 사람 S100A4, S100A2, periostin 및 G3PDH의 유전자의 염기서열과 동일한지 확인하여 northern 분석에 probe로 이용하였다.

4. 후보유전자들의 northern 분석

배양 치주인대 섬유모세포와 치은섬유모세포의 total RNA 15μg을 각 각 0.8% agarose gel에 전기영동하고 nylon membrane(Hybond N, Amersham)을 이용하여 blotting하였다. 사람 S100A4, S100A2, periostin 및 G3PDH의 유전자 단편들을 각 각 probe로 하여 [α -P³²]-dCTP와 random priming kit(Amersham)를 이용 labelling하여 30% formamide, 4X SSC, 1X Denhart's solution 및 SDS가 함유된hybridization 용액에서 42℃, 16-20시간 incubation 하고 2X SSC,

0.1% SDS용액으로 1-2시간 수세한 후 X-ray film(Kodak)에 노출시키고 5-10일 후 현상하여 유전자들의 발현을 확인하였다.

III. 실험 결과

1. RT-PCR을 이용한 S100A4, S100A2 및 periostin mRNA의 발현 분석

배양 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 RT-PCR을 이용한 S100A4, S100A2 및 periostin mRNA의 발현 분석에서 periostin(OSF2) 유전자는 사람 치주인대 섬유모세포에서 강하게 발현되었으나 치은 섬유모세포에서는 그 발현을 거의 관찰할 수 없었고(Figure 1A), S100A2 칼슘결합단백 유전자는 사람 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포에서 모두 강하게 발현되었으나 그 발현의 차이는 관찰할 수 없었으며(Figure 1B), S100A4 칼슘결합단백 유전자는 사람 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포에서 그 발현이 관찰되었으나 사람 치주인대 섬유모세포에서 사람 치은 섬유모세포보다 강하게 관찰되었다(Figure 1C). 동량의 RNA를 이용하여 치주인대 섬유모세포와 치은 섬유모세포에서 S100A4, S100A2 및 periostin의 발현을 동시에 비교한 결과 치주인대 섬유모세포에서는 그 발현이 S100A4, S100A2의 순서로 강하게 나타났으나 periostin은 미약한 발현을 나타냈으며, 또한 치은 섬유모세포에서

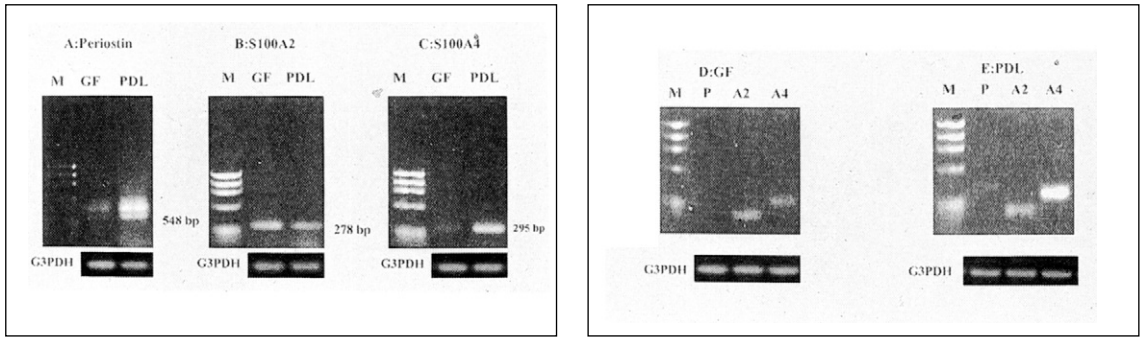


Figure 1. Expression of human periostin(A), S100A2(B), and S100A4(C) mRNAs in periodontal ligament fibroblasts and gingival fibroblasts analysed by RT-PCR(Left). Expression of periostin, S100A2, and S100A4 in periodontal ligament fibroblasts(D) and gingival fibroblasts(E) analysed by RT-PCR(Right). G3PDH: human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and was used as a positive control.

는 그 발현이 periostin, S100A2, S100A4의 순서로 증가된 양상을 보였다(Figure 1D, 1E). 모든 실험에서 대조 유전자로 사용한 G3PDH 유전자는 동일한 발현을 보였다(Figure 1A, 1B, 1C, 1D, 1E).

2. RT-PCR에서 얻은 S100A4, S100A2 및 periostin 유전자 단편들의 확인.

RT-PCR에서 분리된 유전자단편들을 subcloning하고 sequencing한 후 sequence tag를 만들어 blast search program(NIH)을 이용하여 database상의 사람 S100A4, S100A2, periostin 및 G3PDH의 유전자의 염기서열과 동일한지 확인한 결과, 각 각의 유전자 단편들은 사람의 S100A4, S100A2, periostin 및 G3PDH의 유전자의 염기서열과 동일 한 것으로 확인되었다(Figure 2A, 2B, 2C, 2D).

3. Northern 분석을 이용한 S100A4, S100A2 및 periostin mRNA의 발현 분석

Periostin(OSF2) 유전자는 3,200bp 정도의 크기로 사람 치주인대 섬유모세포에서 강하게 발현되었으나 치은 섬유모세포에서는 미약한 발현을 나타냈으며(Figure 3A), S100A2 칼슘결합단백 유전자는 290bp크기로 사람 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유

모세포에서 모두 강하게 발현되었고(Figure 3B), S100A4 칼슘결합단백 유전자는 600bp 정도의 크기로 그 발현이 사람 치주인대 섬유모세포에서 사람 치은 섬유모세포보다 강하게 관찰되었다(Figure 3C).

IV. 총괄 및 고찰

현재까지의 치주인대의 발생과 분화에 관한 연구들을 요약하면, 1980년대에는 치주인대세포들의 형태학적 및 기능적 특성을 규명하는 연구들이 주로 이루어 졌으며, 1990년대에는 치주인대세포의 epidermal growth factor(EGF) binding site, 치주인대세포의 제 XII형 교원질과 S100 칼슘결합단백계(S100 calcium-binding protein family)의 발현 및 최근에는 치주인대세포의 osteoclast specific factor-2(OSF-2, periostin)의 특이적 발현에 관한 보고들로 대별할 수 있다¹⁷⁻²³⁾. 그러나 이러한 연구 결과들은 주로 치주인대 섬유모세포의 분화에 직접 관련이 없거나, 치주인대의 골모세포나 백악모세포 등의 특이 인자들에 관한 것으로 볼 수 있으며, 결국 이는 치주인대의 발생 과정을 전체적인 치주인대세포의 관점에서 이해하려고 하는 데에도 그 문제점이 있다고 할 수 있다. 본 연구는 치주인대의 발생과정을 치은 섬유모세포와 비교하여 치주인대 섬유모세포의 분화과정에서부터 이해하기 위하여, 여러 연구자들의 치주인대세포 특

```

>ref|NM_006475.1| Homo sapiens osteoblast specific factor 2 (fascin-like) (OSF-2)
      mRNA
      Length = 3213

Score = 1070 bits (540), Expect = 0.0
Identities = 546/548 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1   aaactcctctatccagcagacacacctgttggaatgatcaactgctggaataacttaat 60
          |||
Sbjct: 1887 aaactcctctatccagcagacacacctgttggaatgatcaactgctggaataacttaat 1946

Query: 61   aaattaatcaaatatcatccaaattaagttgttcgtggttagcaccttcaaagaaatcccc 120
          |||
Sbjct: 1947 aaattaatcaaatatcatccaaattaagttgttcgtggttagcaccttcaaagaaatcccc 2006

Query: 121  gtgactgtctatacaactaaaattataaccaaaagttgtggaacaaaaattaaagtgaatt 180
          |||
Sbjct: 2007 gtgactgtctatacaactaaaattataaccaaaagttgtggaacaaaaattaaagtgaatt 2066

Query: 181  gaaggcagtccttcagcctattatcaaaactgaaggaccacactaacaagaagtcacaaat 240
          |||
Sbjct: 2067 gaaggcagtccttcagcctattatcaaaactgaaggaccacactaacaagaagtcacaaat 2126

Query: 241  gaagggtgaacctgaattcagactgattaaagaagggtgaacaataactgaagtgaattccat 300
          |||
Sbjct: 2127 gaagggtgaacctgaattcagactgattaaagaagggtgaacaataactgaagtgaattccat 2186

Query: 301  ggagagccaattattaaaaatacaccaaaatcattgatggagtgcctgtggaataacct 360
          |||
Sbjct: 2187 ggagagccaattattaaaaatacaccaaaatcattgatggagtgcctgtggaataacct 2246

Query: 361  gaaaaagagacacgagaagaacgaatcattacaggctcctgaaataaaatacactaggatt 420
          |||
Sbjct: 2247 gaaaaagagacacgagaagaacgaatcattacaggctcctgaaataaaatacactaggatt 2306

Query: 421  tctactggagggtggagaacagaagaactctgaagaaattgttacaagaagagggtcacc 480
          |||
Sbjct: 2307 tctactggagggtggagaacagaagaactctgaagaaattgttacaagaagagggtcacc 2366

Query: 481  aagggtcaccaaaattcattgaagggtggtgatggtcatttatttgaagatgaagaaattaaa 540
          |||
Sbjct: 2367 aagggtcaccaaaattcattgaagggtggtgatggtcatttatttgaagatgaagaaattaaa 2426

Query: 541  agactgct 548
          |||
Sbjct: 2427 agactgct 2434

```

Figure 2A. Identification of human periostin. Results from a BLAST search indicating the homology between the nucleotide sequence of the cDNA obtained from RT-PCR to that of human periostin (dbj/D1366.1/HUMOSF2OS).

이 인자들을 적용하여 생체의 특성과 동일한 치은 섬유모세포와 치주인대세포의 배양 system을 확립하고, 이를 치주인대 섬유모세포 분화인자의 동정에 응용하고자 하였다.

Osteoblast-specific factor 2(OSF-2)는 MC3T3-E1과 NIH3T3 세포주의 cDNA 유전자 도서관에서 subtraction hybridization과 differential screening을 통하여 동정한 것으로 4개의 전사체(transcripts)를 가지고있

emb|Y07755.1|HSS100A2 Homo sapiens S100A2 gene, exon 1-3
Length = 8670

Score = 551 bits (278), Expect = e-155
Identities = 278/278 (100%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1   aagagggcgacaagttcaagctgagtaagggggaaatgaaggaacttctgcacaaggagc 60
          |||
Sbjct: 6385 aagagggcgacaagttcaagctgagtaagggggaaatgaaggaacttctgcacaaggagc 6444

Query: 61   tgcccagctttgtgggggtgagtggcacaggcctgtgggggaggtcctggtgtgagtgtg 120
          |||
Sbjct: 6445 tgcccagctttgtgggggtgagtggcacaggcctgtgggggaggtcctggtgtgagtgtg 6504

Query: 121   ggggtgcaggttaaattctctccccagttccgggtgcctgtcgatgcaggtgccagggtg 180
          |||
Sbjct: 6505 ggggtgcaggttaaattctctccccagttccgggtgcctgtcgatgcaggtgccagggtg 6564

Query: 181   gggcccagcccctccccacttttagcttcatggctccactggagtggaaatgaggcccag 240
          |||
Sbjct: 6565 gggcccagcccctccccacttttagcttcatggctccactggagtggaaatgaggcccag 6624

Query: 241   tgggagtgccttaattaatggctgtttcctgcaacattc 278
          |||
Sbjct: 6625 tgggagtgccttaattaatggctgtttcctgcaacattc 6662
```

Figure 2B. Identification of human S100A2. Results from a BLAST search indicating the homology between the nucleotide sequence of the cDNA obtained from RT-PCR to that of human S100A2(emb/Y07755.1/HSS100A2).

는 90 kDa 단백질로 골모세포와 골모세포양 세포주에서 분비되며^{24,25)}, 최근에 Horiuchi 등¹⁶⁾에 의하여 periostin으로 명명되었다. 또한, TGF- β 에 의하여 골막 팽창(periosteal expansion) 즉 골막에 골모세포 전구세포의 부착(attachment of osteoblast precursors in the periosteum)과 골모세포 전구세포를 모여 들게 하는데 효과가 높은 것으로 알려져 있다. 생쥐 periostin은 811개의 아미노산으로 구성되어있으며

네 개의 반복되는 특징적인 도메인(domain)을 가지고 있는 세포-세포 부착 물질(cell-cell adhesion molecule)로 중추신경계에서 발현되는 fascilin과 유사한 구조를 보이며 TGF- β 에 의해 유도되어 섬유모세포의 세포 퍼짐(spreading)과 부착(attachment)을 증진시키는 것으로 알려진 β ig-h3와 유사한 단백질 구조를 나타내는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서 Periostin(OSF2) 유전자가 RT-PCR과 Northern 분석

>ref[NM_002961.2] Homo sapiens S100 calcium-binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog) (S100A4), transcript variant 1, mRNA
Length = 512

Score = 577 bits (291), Expect = e-162
Identities = 294/295 (99%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1   ctcagcgcttcttcttcttcttgggttgatcctgactgctgtcctggcgtgccctctggaga 60
          |||
Sbjct: 29  ctcagcgcttcttcttcttcttgggttgatcctgactgctgtcatggcgtgccctctggaga 88

Query: 61  aggccctggatgtgatgggtgtccaccttccacaagtactcgggcaaagagggtgacaagt 120
          |||
Sbjct: 89  aggccctggatgtgatgggtgtccaccttccacaagtactcgggcaaagagggtgacaagt 148

Query: 121 tcaagctcaacaagtcagaactaaaggagctgctgacccgggagctgccagcttcttgg 180
          |||
Sbjct: 149 tcaagctcaacaagtcagaactaaaggagctgctgacccgggagctgccagcttcttgg 208

Query: 181 ggaaaaggacagatgaagctgctttccagaagctgatgagcaacttggacagcaacaggg 240
          |||
Sbjct: 209 ggaaaaggacagatgaagctgctttccagaagctgatgagcaacttggacagcaacaggg 268

Query: 241 acaacgaggtggacttccaagagtactgtgtcttctgtcctgcatcgccatgat 295
          |||
Sbjct: 269 acaacgaggtggacttccaagagtactgtgtcttctgtcctgcatcgccatgat 323
```

Figure 2C. Identification of human S100A4. Results from a BLAST search indicating the homology between the nucleotide sequence of the cDNA obtained from RT-PCR to that of human S100A4(ref/NM-002961.2).

에서 사람 치주인대 섬유모세포에서 강하게 발현되었으나 치은 섬유모세포에서는 그 발현을 거의 관찰할 수 없었는데, 이는 치주인대섬유모세포군에 포함되어 있는 골모세포 전구세포(osteoblast precursor cell)에 periostin이 있어서 발현이 관찰된 것으로 생각할 수 있으며, 따라서 순수 치주인대 섬유모세포에서 발현되는 유전자로는 생각할 수 없으나 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포군을 구별하는데에는 사용될 수 있음을 나타낸다.

S100 칼슘결합 단백질(S100 calcium-binding protein)은 저 분자량의 산성 단백질로 EF-hand 형태의

Ca²⁺-binding domain을 갖고 있다. S100 칼슘결합 단백질에는 17종의 단백질이 있는 것으로 밝혀졌으며, 그중 S100 A4는 특정 배양 종양세포에서 발현이 증가하여 세포의 운동, 종양의 전이 및 형질 변환에 관여하나 정상 세포에서는 그 기능이 확실치 않았으나, 최근에 치주인대세포에서 그 발현이 확인되고 세포 배양에서 농도 의존적으로 석회화 결절의 형성을 방해하는 작용이 확인되어 치주인대의 폭경 유지에 중요한 기능을 시사하고 있다. S100A2도 S100 칼슘결합 단백질의 일종으로 치주인대에서 그 발현이 보고되어 치주인대세포에서의 독특한 기능이 기대되고

```

>gb|J02642.1|HUMG3PDC Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mRNA
      Length = 1204

Score = 872 bits (440), Expect = 0.0
Identities = 449/452 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1   accacagtccatgccatcactgccacccagaagactgtcgatggccccctccgggaaactg 60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 527 accacagtccatgccatcactgccacccagaagactgtcgatggccccctccgggaaactg 586

Query: 61   tggcgtgatggccgcggggctctccagaacatcatccctgcctctactggcgctgccaaag 120
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 587 tggcgtgatggccgcggggctctccagaacatcatccctgcctctactggcgctgccaaag 646

Query: 121  gctgtgggcaaggtcatccctgagctgaacgggaagctcactggcatggccttccgtgtc 180
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 647 gctgtgggcaaggtcatccctgagctgaacgggaagctcactggcatggccttccgtgtc 706

Query: 181  ccaactgccaacgtgtcagtggtggacctgacctgccgtctagaaaaacctggcaaatat 240
          || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 707 cccactgccaacgtgtcagtggtggacctgacctgccgtctagaaaaacctggcaaatat 766

Query: 241  gatgacatcaagaagtggtgaaccaggcgtcggaggggccccctcaagggcattcctgggc 300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 767 gatgacatcaagaagtggtgaaccaggcgtcggaggggccccctcaagggcattcctgggc 826

Query: 301  tacactgagcaccaggtggtctcctctgacttcaacagcgacaccactcctccaccttt 360
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 827 tacactgagcaccaggtggtctcctctgacttcaacagcgacaccactcctccaccttt 886

Query: 361  gacgctggggctggcattgccctcaacgaccactttgtcaagctcatttcctggtatgac 420
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 887 gacgctggggctggcattgccctcaacgaccactttgtcaagctcatttcctggtatgac 946

Query: 421  aacgaatttggctacagcaacagggtggtgga 452
          ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 947 aacgaatttggctacagcaacagggtggtgga 978

```

Figure 2D. Identification of human G3PDH. Results from a BLAST search indicating the homology between the nucleotide sequence of the cDNA obtained from RT-PCR to that of human G3PDH(gb:HUMG3PDC).

있다. Duarte 등¹⁵⁾의 소의 치아와 치주조직을 이용한 Northern 분석 연구에서 S100A4는 맹출한 치아의 치주인대에서 강하게 발현되며 맹출 중인 치아와 치은

조직에서는 약한 발현을 나타내고 치수조직에서도 강한 발현을 나타낸다고 보고하였으며, S100A2는 맹출한 치아의 치주인대와 치은에서 강하게 발현된다

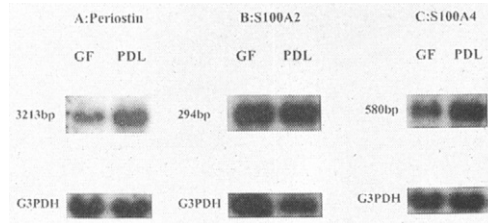


Figure 3. Northern analysis of human periostin, S100A2 and S100A4 cDNA. Total RNA(15 μ g) isolated from cultured periodontal ligament(PDL) fibroblasts and gingival fibroblasts GF) were fractionated on a 1% formaldehyde/agarose gel and Northern blotting was carried out as described in material and methods.(A) Expression of periostin mRNA in cultured periodontal ligament fibroblasts and gingival fibroblasts. 548 bp periostin cDNA fragment from Figure 1(A) was used as a probe.(B) Expression of S100A2 mRNA in cultured periodontal ligament fibroblasts and gingival fibroblasts. 278 bp S100A2 cDNA fragment from Figure 1(B) was used as a probe.(C) Expression of S100A4 mRNA in cultured periodontal ligament fibroblasts and gingival fibroblasts. 295 bp S100A4 cDNA fragment from Figure 1(C) was used as a probe. GF, gingival fibroblast; PDL, periodontal ligament. G3PDH is human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and was used as a positive control.

고 하였다. 본 실험에서는 사람 배양 치은섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 RT-PCR과 Northern 분석에서 S100A2 칼슘결합단백 유전자는 사람 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포에서 모두 강하게 발현되었으나 그 발현의 차이는 관찰 할 수 없었으며, S100A4 칼슘결합단백 유전자는 사람 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포에서 그 발현이 관찰되었으나 사람 치주인대 섬유모세포에서 사람 치은 섬유모세포보다 강하게 관찰되었다. 이 결과는 사람의 치주인대에서도 S100A2와 S100A4가 발현이 되며 그 양상은 소의 맹출한 치아에서의 결과와 유사한 것으로 보인다. S100A4 등이 석회화 결절의 형성 방해와 같은 기능이 알려져 있고 맹출 전보다는 후에서 발현이 강하게 나타난 보고로 볼 때, S100칼슘결합단백은 초기 치주인대섬유모세포 분화과정에서는 중요한 역할을 하지 못하나 치은섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 구별 및 맹출 전 후의 치주인대세포를 구별하는 인자로서 사용될 수 있음을 시사한다.

치주인대세포의 분화에 관하여는 치주인대를 구성하는 세포들이 동일한 모세포에서 유래한 것인지 아니면 각 각 서로 다른 모세포에서 유래하는 것인지 조차 명확히 밝혀져 있지 않기 때문에, 치주질환의 치료에 수반되는 치주조직의 치유와 재생과정에

관여하는 세포들의 정확한 활동양상을 이해하는 데도 많은 어려움이 있다^{26,27}. 그러나 치주인대의 분화과정은 모세포의 동일 유무와는 상관없이, 상피세포가 치아발생의 초기과정과 유사하게 상피-간엽 관계(epithelial-mesenchymal relationship)에 의하여 특정 인자를 만들어서 일차적으로 미분화 간엽세포들의 분화를 유도하고, 이어서 각 각의 미분화 간엽세포들로부터 이차적으로 치주인대 섬유모세포, 골모세포, 및 백악모세포의 특이 유전자가 발현되어 특정세포로 분화하는 것으로 요약될 수 있다. 따라서 치주인대의 분화과정을 규명하기 위해서는 먼저 치주인대 섬유모세포가 동일한 간엽조직에서 유래하며 치주조직의 다른 부분을 구성하는 치은 섬유모세포에 비하여 독특하게 나타내는 유전자를 검출하여 클로닝하고, 더 나아가 이 유전자가 치주조직의 발생을 유도하는 상피-간엽 상호관계에서 어떠한 역할을 하는지 two hybrid method 등의 단백질-단백질 상호활동 연구를 이용하여 연관성을 밝히는 것이 필요하다.

따라서 본 연구에서 배양 사람 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에서 S100A4와 periostin 유전자의 발현의 차이를 확인하고 생체와 동일한 세포의 특성을 배양 세포에서 재현할 수 있음을 확인 한 결과는 치주인대섬유모세포 특이인자의 동정 뿐 아니

라 더 나아가서는 치주조직 발생의 과정을 전체적으로 이해하고, 그 결과를 치주인대 재생 물질의 개발 등의 과정을 통하여 치주질환의 치료에 응용하는데에 중요한 기초 자료로 응용 될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

사람 치은섬유모세포와 치주인대 섬유모세포의 특성을 규명할 목적으로, 사람 치은섬유모세포와 치주인대 섬유모세포를 배양하여 치주인대 폭경유지에 관여하는 S100A4와 S100A2 칼슘결합단백 유전자와 periostin(OSF2) 유전자의 발현을 RT-PCR과 Northern 분석을 이용하여 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. S100A2 칼슘결합단백 유전자는 RT-PCR과 Northern 분석에서 사람 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포에서 모두 강하게 발현되었으며 그 발현의 차이는 관찰 할 수 없었다.
2. S100A4 칼슘결합단백 유전자는 RT-PCR과 Northern 분석에서 사람 치주인대 섬유모세포에서 사람 치은 섬유모세포보다 강하게 발현되었다.
3. Periostin(OSF2) 유전자는 RT-PCR과 Northern 분석에서 사람 치주인대 섬유모세포에서 강하게 발현되었으나 치은 섬유모세포에서는 그 발현을 거의 관찰 할 수 없었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 S100A4 칼슘결합단백과 periostin(OSF2) 유전자는 사람 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포를 구분하는 표지자로 이용 될 수 있으며 이 결과는 향후 치주인대 섬유모세포 특이 유전자의 동정 등의 연구에 중요한 자료로 이용 될 수 있을 것으로 사료된다.

VI 참고 문헌

1. Phipps, R.P. Borrello, M.A. Blieden, T.M.

- "Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues." *J Periodont. Res.* **32**:159-165, 1997.
2. Fries, K.M. Blieden, T. Looney, R.J. Sempowski, G.D. Silvera, M.R. Willis, R.A.. "Evidence of fibroblast heterogeneity and the role fibroblast subpopulations infibrosis." *Clin. Immunol. Immunopathol.* **72**:283-292, 1994.
3. Hakkinen, L. Larjava, H.. "Characterization of fibroblast clones from periodontal granulation tissue in vitro." *J Dent. Res.* **71**:1901-1907, 1992.
4. Irwin, C.R. Picardo, M. Ellis, I. Sloan, P. Grey, A.M. McGurk, M.. "Inter-and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-link phenotypic characteristicsby gingival fibroblasts: potential significance for wound healing." *J Cell Sci.* **107**:1333-1346, 1994.
5. Boyko, G.A. Melcher, A.H. Brunette, D.M.. "formation of new periodontal ligament byperiodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro." *J Periodontal Res.* **16**:73-88, 1981.
6. Gottlow, J. Nyman, S. Karring, T. Lindhe, J.. "New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration." Case reports. *J clin. Periodontol* **13**:604-616, 1986
7. Giannopoulou, C. Cimasoni, G.. "Functional characteristics of gingival and periodontalligament fibroblasts." *J Dent. Res.* **75**:895-902, 1996.
8. Hou, L.T. Yaeger, J.A.. "Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblasts." *J Periodontol* **64**:1209-1218, 1993.
9. Brady, T.A. Piesco, N.P. Buckley, M.J. Langkamp, H.H. Bowen, L.L. Agarwal, S.. "Autoregulation of periodontal ligament cell phenotype and functions by transforming growth factor- β 1." *J Dent. Res.* **77**(10):1779-1790, 1989.

10. Cho, M.I. Matsuda, N. Lin, W.L. Moshier, A. Ramakrishnan, P.R.. "In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat." *Calcif. Tissue Int.* **50**:459-167, 1992.
11. Dennison, D.K. Vallone, D.R. Pinero, G.J. Rittman, B. Caffesse, R.G.. "Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingivalfibroblasts." *J Periodontol.* **65**:641-648, 1994.
12. Somerman, M.J. Foster, R.A. Imm, G.M. Sauk, J.J. Archer, S.Y.. "Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro." *J Periodontol.* **60**(2):73-77, 1989.
13. Wise, G.E. Zhao, L. Grier IV, R.L.. "Localization and expression of CSF-1 receptor in rat dental follicle cells." *J Dent Res* **76**(6): 1244-1249, 1997.
14. Kawase, T. Sato, S. Miake, K. Saito, S.. "Alkaline phosphatase of human periodontalligament fibroblast-like cells." *Adv. Dent. Res.* **2**:234-239, 1988.
15. Duarte, W.R. 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.
16. Horiuchi, K. Amizuka, N. Takeshita, S. Takamatsu, H. Katsuura, M. Ozawa, H. Toyama, Y. Bonewald, L.F. Kudo, A.. "Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression of periosteum and periodontal ligament increased expression by transforming growth factor β ." *J Bone Mineral Res.* **14**(7):1239-1249, 1999
17. Amar, S.. "Implication of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration." *Anat Rec* **245**:361-373, 1996.
18. Brandsten, C. Lundmark, C. Christersson, L. Hammarstrom, L. Wurtz, T.. "Expression of collagen α 1(I) mRNA variants during tooth bone formation in the rat." *J Dent. Res.* **78**(1):11-19, 1999.
19. Gao, J. Symons, A.L. Bartold, P.M.. "Expression of transforming growth factor-beta1(TGF- β 1) in the developing periodontium of rats." *J Dent. Res.* **77**(9):1708-1716, 1990.
20. Kuru, L. Parker, M.H. Griffiths, G.S. Newman, H.N. Olsen, I.. "Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells." *J Dent. Res.* **77**(4):555-564, 1998.
21. Matsuda, N. Yokoyama, K. Takishita, S. Watanabe, M.. "Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontalligament cells in vitro." *Archiv. Oral Biol.* **43**:987-997, 1998.
22. Ramakrishnan, P.R. Lin, W.L. Sodek, J. Cho, M-I.. "Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro." *Calcif. Tissue Int.* **57**:52-59, 1995.
23. Strutz, F. Okada, H. Cecilia, W.L. Danoff, T. Carone, R.L. Tomaszewski, J.E. Neilson, E.G.. "Identification and characterization of a fibroblast marker:FSP1." *J Cell Biol.* **130**:393-405, 1995.
24. LeBaron, R.G. Bezverkov, K.I. Zimmer, M.P. Pavelec, R. Skonier, J. Purchio, A.F.. "Beta IG-H3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor-beta, is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro." *J Invest. Dermatol.* **104**:844-849, 1995.
25. Zinn, K. Mcallister, L. Goodman, C.S.. "Sequence analysis and neuronal expression of fascilin I in grasshopper and *Drosophila*." *Cell* **53**:577-587, 1988.
26. Cho, M.I. Garant, P.R.. "Expression and role of epidermal growth factor receptors during differ-

- entiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat." *Anat. Rec.* **245**:342-360, 1996.
27. Lekic, P. McCulloch, C.A.G.. "Periodontal ligament cell population: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue." *Anat. Rec.* **245**:327-341, 1996.
28. Duarte, W.R. Kasugai, S. Iimura, T. Oida, S. Ohya, K. Ishikawa, I.. "cDNA cloning of S100 calcium-binding protein from bovine periodontal ligament and their expression in oral tissues." *J Dent. Res.* **77**(9):1694-1699, 1998.

Expression of Periostin and S100A2- S100A4-Calcium Binding Proteins mRNA in Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Fibroblasts

Byung-Ock Kim¹⁺, Kyung-Yoon Han¹⁺, Young-Sun Choi¹, Se-Hoon Kim¹,
Byung-Gi Park¹, Heung-Joong Kim²⁺, Joo-Cheol Park^{3*,+}

Dept. of Periodontology¹, Dept. of Oral Anatomy², Dept. of Oral Histology³
Chosun University, Oral Biology Research Institute⁺
College of Dentistry, Chosun University

Gingival fibroblasts (GF) and periodontal ligament fibroblasts (PDLF) are the major cellular components of periodontal soft connective tissues, but the precise molecular biological differences between these cells are not yet known. In the present study, we investigated the expression of S100A4, S100A2 calcium-binding protein and osteoblast-specific factor 2 (OSF-2, Periostin) mRNA in GF and PDLF in vitro through the process of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Northern blot analysis in each. Human GF and PDLF were isolated from the gingival connective tissue and the middle third of freshly extracted healthy third molars. They were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum and cells in the third passage were used in the experiments. After extracting total RNA from cultured cells, RT-PCR and Northern analysis were performed using S100A4-, S100A2- and Periostin-specific oligonucleotide primers and subcloned cDNA probes in each.

In RT-PCR and Northern analysis, the expression of S100A4 and Periostin mRNA in GF was slightly detectable. Interestingly, the expression of S100A4 and Periostin mRNA in PDLF was much higher than that in GF. On the other hand, S100A2 mRNA was highly expressed in both GF and PDLF. Since there was a marked difference of S100A4 and Periostin expression between GF and PDLF in vitro, these data suggest that S100A4 and Periostin could be used as a useful marker for distinguishing cultured gingival fibroblasts and periodontal ligament cells.

Key words; Periostin, S100A4, S100A2

* Address Correspondence and reprint requests to Dr. Park: Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University, 421 Seosuk-dong, Dong-gu, Kwang-Ju City, Korea; jcpark@mail.chosun.ac.kr, 230-6874