

치주인대 섬유아세포에서 Osteoprotegerin과 Osteoclast Differentiation Factor의 발현

류성훈 · 허수례 · 김형섭 · 오귀옥*

전북대학교 치과대학 치주과학교실, 전북대학교 구강생체과학연구소, (주) Oscotec*

I. 서론

골은 끊임없이 변화하는 조직으로써 치조골을 포함한 정상적 골조직은 조골세포에 의한 골형성과 파골세포에 의한 골흡수 과정에 의해 성장과 개조를 나타낸다¹⁾. 이중 골 흡수를 담당하는 파골세포는 1873년 Kolliker에 의하여 처음으로 명명되었으며²⁾ Suda 등³⁾은 조혈조직에서 기원한 단핵세포가 융합하여 파골세포가 형성된다고 하였다. 최근 여러 연구들에서 파골세포의 분화 및 기능에 조골세포/기질세포가 밀접히 연관되어 있음이 증명되었으며, 파골세포 형성을 위하여서는 조골세포/기질세포와 파골세포 전구세포의 세포-세포간 접촉이 필수적이라 하였고, 조골세포 및 골수 기질세포 세포막에 파골세포 분화인자가 있을 것으로 제안되어졌다^{4,6)}. 조골세포/기질세포는 M-CSF를 생성하여 파골세포 생성을 도와주는 것으로 알려져 왔으며, 최근에는 파골세포 분화와 관련된 몇가지 분자들이 발견되었다. 1997년에 골수세포를 배양하여 파골세포 형성을 억제하는 단백질인 osteoprotegerin (OPG)을 인간 섬유아세포에서 발견하였고⁷⁾, 1998년에는 OPG가 파골세포의 분화를 유도하는 기질세포에 결합한다고 하였으며⁸⁾, 이 OPG 결합 단백질이 파골세포의 분화를 유도하는 osteoclast differentiation factor (ODF)⁹⁾라고 하였다. osteoprotegerin (OPG)/ osteoclastogenesis inhibitory fac-

tor (OCIF)는 TNF receptor family의 일원으로 조골세포를 포함한 여러 세포에서 분비되는 당단백으로서, 수용성 형태로 존재하며 60 kDa 분자량을 지닌 monomer와 120 kDa 분자량을 지닌 homodimer 2가지 형태를 지닌다⁷⁾. OPG/OCIF는 dose-dependent하게 파골세포 형성을 억제할 뿐만 아니라 성숙 파골세포에 직접 작용함으로써 골흡수를 억제하기도 한다¹⁰⁾. 즉 OCIF/OPG는 decoy receptor로서 ODF와 결합하여 파골세포 분화와 활성을 억제하는 것으로 보고되어 있다. OPG는 골조직과 관련된 세포외에도 foreskin 섬유아세포와 같은 primary fibroblast와 lung fibroblast cell line인 IMR-10에서 그 mRNA발현이 관찰되었다¹¹⁾. ODF는 TNF ligand family의 일원으로 세포막 관통 단백질로서 파골세포의 분화를 유도하며 40-45 kDa 단백질로서 존재한다. 반면 수용성 ODF는 31 kDa의 분자량을 지니며 생물학적으로 활성상태인 것으로 추측된다고 하였다¹²⁾.

또한 OPG의 ligand인 OPGL(osteoprotegerin ligand)은 생체외 및 생체내에서 파골세포 형성과 활성화를 유발하는데 이는 ODF와 동일한 물질임이 확인되었으며 활성화된 T 림프구에서 분비되고 수상돌기세포의 생존인자로 작용하는 TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine)와 RANKL (receptor activator for NF- κ B ligand)도 동일한 분자구조인 것으로 밝혀졌다¹³⁻¹⁵⁾. 수용성의 ODF는 생체외에서 파

골세포의 생존력을 높이고 분화와 활성화를 유도하여 파골세포 시스템에서 기질세포를 대체할 수 있었으며¹⁶⁻¹⁸⁾ ODF 유전자가 결핍된 생쥐에서는 파골세포가 나타나지 않고 골경화증이 나타남이 보고되었다¹⁹⁾. ODF mRNA는 골이나 림프구에만 국한되지 않고 거대핵세포나 뇌, 심장, 신장, 골격근, 피부에 있는 각화세포, 섬유아세포, 모세혈관과 심지어는 파골세포 자체에서도 발견되었다²⁰⁾. RANK는 TNF receptor family의 일원으로서 ODF의 수용체로 파골전구세포 표면에 발현되어 세포-세포간 접촉시 ODF와 결합함으로써 파골세포 분화를 야기한다고 알려져 왔다⁹⁾.

치주조직은 치은, 백악질, 치조골, 치주인대로 구성되어 이중 치주인대는 매우 특수화된 결합조직으로서 백악질과 치조골을 연결한다. 치주인대 세포는 조골세포, 파골세포, 섬유아세포, Malassez 상피세포 잔사, 대식세포, 미분화된 간엽세포, 백아세포등으로 구성된다²¹⁾. 이중 섬유아세포는 치주인대의 주된 세포군으로서 알칼리성 인산효소 활성도가 높으며²²⁾ 이 효소는 골대사와 백악질형성에 있어 phosphate 대사를 위한 필수조건으로 알려져 있으므로²³⁻²⁴⁾ 조골 유사세포의 특징을 가지고 있다고 생각할 수 있다. 또한 치주인대 세포들이 파골세포 분화와 골흡수를 억제하는 인자를 분비하는 것으로 보고되기도 하였으며²⁵⁻²⁶⁾ Sakata 등²⁷⁾은 이들 세포에서 OPG/OCIF mRNA를 보고하기도 하였다.

최근에 Wada 등²⁸⁾은 치주인대 섬유아세포에서 파골세포 형성과 기능을 억제하는 인자인 OPG/OCIF를 포함하고 있다고 보고하였으며 Kanzaki 등²⁹⁾은 RANKL 촉진과 OPG 억제를 통하여 치주인대 섬유아세포가 파골세포 분화를 조절한다고 하였다. 따라서 사람의 치주인대 섬유아세포가 치조골대사에 중요한 역할을 할 것으로 사료되어 본 연구의 목적은 조골세포와 유사한 표현형을 지닌 치주인대 섬유아세포에서 파골세포 분화를 위하여 필요한 인자들이 조골세포와 유사하게 발현되는지 여부를 밝히고, 또한 기염증성 물질들에 의하여 이들 인자들의 발현이 조절되는지 밝힘으로써, 치주질환의 치조골 파괴에 대한 분자수준의 기전을 규명하기 위하여 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포배양

치주인대섬유아세포(periodontal ligament fibroblast, PDLF) 분리 및 배양

치아교정치료를 위하여 발치한 건강한 17세 한국 남성의 치아에서 PDLF 세포를 분리해 내었다. 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin 및 100 unit/ml streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, MO)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, GibcoBRL, NY)에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하면서, 매 3일마다 신선한 배양액을 절반씩 교환하여 주었으며, 계대번호 4에서 9번까지의 세포를 본 실험에 이용하였다.

1) Jurkat, SaOs 배양

사람의 helper T 임파구세포주인 Jurkat은 10% FBS과 항생제가 포함된 RPMI1640 (GibcoBRL, NY)에서 배양하였고, 사람의 osteosarcoma 세포주인 SaOs는 Minimum Essential Medium Alpha (α -MEM, GibcoBRL, NY)에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

2. 세포의 자극

역전사 다중합연쇄작용을 위하여 PDLF 세포를 1 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide (LPS, Sigma, MO)로 2, 4, 8시간, 5 ng/ml IL-1 β (PeproTech, UK)로 2, 4, 8시간, 10⁻⁸M 1,25(OH)₂D₃ (Biomol, PA) + 10⁻⁷M dexamethasone (Sigma, MO)으로 3일간 각각 처리하였다. Western blot 분석을 위하여는 LPS 4시간, IL-1 β 4시간, 1,25(OH)₂D₃ + dexamethasone 3일간 처리하였다.

3. 역전사 다중합연쇄작용 (RT-PCR)을 이용한 OPG와 ODF 발현 검사

1) Total RNA 분리

ODF가 발현된 PDLF, SaOs, Jurkat 세포에서 total

RNA는 RNeasy Mini kit(QIAGEN사)와 TRI reagent(TR-118, MRC사)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. 먼저 세포들을 PBS로 세척한 후 TRI reagent를 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그리고 클로로포름 200 μ l를 첨가한 후 진탕하고 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상등액을 취해 여기에 동량의 iso-propanol을 첨가한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 적어도 1시간이상 방치한후 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 용액을 버린 후 남아 있는 pellet을 75% 에탄올을 첨가하여 세척한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC, Sigma, MO) 처리된 증류수에 용해시켰다. 이렇게 얻은 total RNA는 spectrophotometer로 정량하였고 1% agarose-formaldehyde gel 전기영동으로 확인하였다.

2) 역전사 다중합연쇄작용(RT-PCR)

TRI reagent를 이용하여 얻은 total RNA로 실시한 역전사 작용조건(reverse transcription reaction)은 다음과 같다. First strand DNA는 random 9 mer primer 2.5 μ M로 annealing하여 1mM dNTPs, 1 unit Rnase inhibitor, 5mM MgCl₂, 1X AMV-RT buffer(Takara, #R019) 조건에서 5 units avian myeloblastosis virus reverse transcriptase XL을 첨가하여 전체 양을 20 μ l로 맞추어 반응시켰다. 반응조건은 30 $^{\circ}$ C에서 10분, 50 $^{\circ}$ C에서 30분, 99 $^{\circ}$ C에서 5분, 5 $^{\circ}$ C에서 5분 열처리하였다. 역전사 과정으로 얻어진 1/3의 반응액을 template로 이용하여 다중합연쇄반응을 실시하였다. 1xPCR buffer 조건하에서 up-stream, down-stream primer는 각각 40 pmol을 사용하였고, 2.5mM MgCl₂, and 5 unit Taq polymerase(Koma biotech)을 첨가하였다. 실험에 사용한 oligonucleotide들은 다음과 같다: osteoclast differentiation factor (ODF, sense; 5'-gggtccataaagtgtgagctg-3', antisense; 5'-ttaaaagcccaagatgtt-3'), osteoprotegerin (OPG, sense; 5'-tacagcaagtggagaccgtg-3', antisense; 5'-tttgatgttccataacttcagcagc-3'), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH, sense; 5'-tgagaacgggaagctgttga-3, antisense; 5'-ggaaggccatgccagtga-3')였다. 다중합연쇄반응 조건은 denaturation은 95 $^{\circ}$ C

에서, annealing은 ODF 50 $^{\circ}$ C, OPG 52 $^{\circ}$ C, GAPDH 54 $^{\circ}$ C에서, polymeration은 72 $^{\circ}$ C에서 각각 1분씩 30cycle 반응시켰다. 다중합연쇄반응 반응물은 1.0% agarose gel에 전기영동하여 다중합연쇄반응 산물의 분자 크기로 확인하였고, HRP-conjugated 되어진 internal DNA probe를 이용하여 southern blot에서 최종 확인하였다.

4. Southern blot 분석

동량 PCR 반응산물을 1.0% agarose gel에 전기영동한 후 0.25M HCl에 15분, 0.5M NaCl/ 1.5M NaCl에 15분, 0.5M Tris-HCl/1.5M NaCl에 15분 차례로 잠기게 하였다. Gel에 전가된 증폭 DNA product는 20x SSC를 buffer로 사용하여 capillary 방법으로 Hybond Plus membrane에 transfer하였고 UV cross-link 하여 고정하였다. Transfer된 membrane은 55 $^{\circ}$ C에서 blocking solution에서 30분 방치한후 Hybrid 시켰다. Signal은 LAS(Luminescent image analyzer, Fujifilm) 시스템을 사용하여 감지하였고 정량화하였다.

5. Western blot을 위한 시료 준비

ODF의 western blot 분석을 위하여 배양된 세포에서 배지를 제거하고 lysis buffer(1% NP40/ 1mM EGTA/PBS, pH 7.5)를 첨가하여 ice상에서 10분간 반응시켰다. 이 시료들은 12,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취해 western blot에 사용하였다. 한편 OPG의 western blot 분석을 위하여는 FBS가 포함되지 않은 배양액으로 16시간 배양한 후 상청액을 1ml 모아서, trichloroacetic acid 용액을 최종 농도 15% 되게 혼합하여 단백질을 침전시켜 이를 western blot 분석에 이용하였다.

6. Western blot 분석

단백질들은 SDS-polyacrylamide gel(10%) 상에서 분리되었다. 단백질 size marker는 Bio-Rad사 것을 사용하였고, PVDF membrane으로 electrotransfer

kit(Bio-Rad사)을 사용하였다. Immunoblot은 Western-Star system(Applied biosystem)을 사용하였다. PVDF membrane은 PBS로 씻은 후 90분동안 blocking buffer로 block한후 1:500으로 희석된 primary OPG, ODF antibody를 90분동안 반응시켰다. 그리고나서 blocking buffer로 5분동안 3회 세척한 후 secondary antibody-alkaline phosphatase를 50분동안 결합시킨후 TBST로 15분동안 3회 세척하였다. 정량은 LAS(Luminescent image analyzer, Fujifilm)를 사용하였다.

III. 결과

1. 치주인대 섬유아세포

사람 치주인대 섬유아세포의 현미경적 소견으로 섬유아세포의 특징적 형태인 잘 발달된 세포돌기를 가지는 방추형 형태를 보여준다(Figure 1).

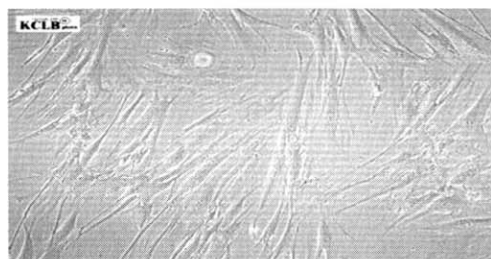
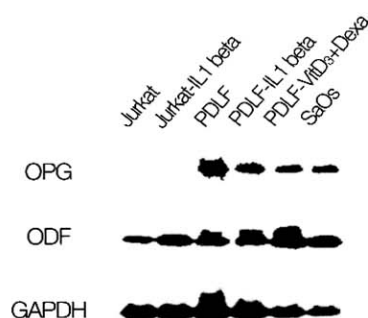


Figure 1. PDLF(Periodontal ligament fibroblast)



2. 치주인대 섬유아세포와 다른 세포에서 OPG & ODF mRNA 발현

PDLF에서 OPG와 ODF mRNA가 발현되는지를 관찰하고자 RT-PCR을 시행하였다. 사람의 helper T 세포주 Jurkat을 ODF mRNA 발현에 대한 positive control로 이용하였으며 SaOs는 사람의 osteosarcoma 세포주로서 조골세포의 표현형을 가지고 있으므로 OPG 및 ODF mRNA 발현에 대한 control로 이용하였다. RT-PCR의 결과가 뚜렷하지 않아 RT-PCR후 OPG 또는 ODF probe를 이용하여 다시 southern blot analysis를 함으로써 각 유전자의 band를 확인할 수 있었다. OPG mRNA는 Jurkat에서는 전혀 발현되지 않았으나 조골세포에서는 다량이 발현되는 것으로 알려진대로 SaOs에서는 뚜렷하게 발현되었다. Steady state의 PDLF에서도 상당히 많은 양의 OPG mRNA가 발현되었으며 housekeeping 유전자인 GAPDH의 발현을 동일하게 환산하였을 경우 1,25(OH)₂D₃ + dexamethasone을 처리한 PDLF가 가장 높은 OPG발현을 나타낸 것으로 계산되었다. ODF는 Jurkat에서 뿐만이 아니라 조골세포주인 SaOs 및 PDLF에서도 발현되었으며 OPG 발현의 경우와 마찬가지로 1,25(OH)₂D₃ + dexamethasone을 처리한 PDLF가 ODF 발현의 경우에서도 가장 높은값을 나타내었다(Figure 2).

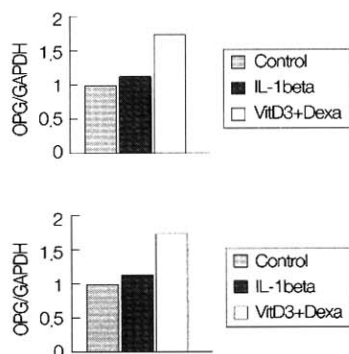


Figure 2. RT-PCR and Southern blot analysis for OPG and ODF mRNA expression in PDLF and other cells.

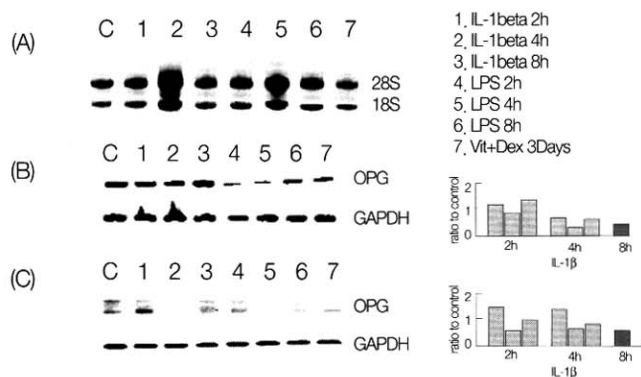


Figure 3. RT-PCR for OPG and ODF mRNA expression in activated PDLF cells.

3. IL-1 β 와 LPS로 PDLF 처리시 OPG와 ODF mRNA 발현

PDLF cells을 2, 4, 8시간 동안 5ng/ml IL-1 β 나 1 μ g/ml LPS 혹은 3일간 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + dexamethasone 으로 자극하거나 자극하지 않은 경우 total RNA를 추출하였다(Figure 3A).

OPG의 경우 IL-1 β 처리한 PDLF에서는 mRNA 발현이 약간 증가되었으나 LPS 처리한 PDLF에서는 크게 감소하였다(Figure 3B).

ODF에 있어서는 IL-1 β 와 LPS 모두 자극 초기에 PDLF에서 mRNA 발현이 증가하는 양상을 나타내었으며 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + dexamethasone을 처리한 PDLF에서는 OPG, ODF mRNA 발현이 모두 감소하였다(Figure 3C).

4. PDLF에서의 OPG 분비

PDLF에서 유리되는 OPG를 측정하기 위하여 16시

간동안 FBS이 제거된 배양액에서 배양하여 그 상청액을 TCA precipitation 방법으로 농축한 후 western blot 분석하였다. Steady state의 PDLF에서도 OPG band가 관찰되었으며 IL-1 β 로 처리한 경우에는 OPG 분비량이 더욱 증가하였으나 LPS나 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + dexamethasone을 처리한 PDLF에서는 약간 감소 혹은 변화가 없는 것으로 관찰되었다(Figure 4).

5. PDLF 세포막에서 ODF 발현

PDLF 세포막에서 발현하는 ODF를 관찰하기 위하여 PDLF cell lysate를 western blot 분석하였다. SaOs와 Jurkat에서는 뚜렷하게 40 kDa 부위에서 ODF band가 관찰되었을 뿐 아니라 soluble ODF로 추정되는 band가 30 kDa 부위에서 관찰되었다. PDLF에서도 미약하지만 두가지 band가 모두 존재하였으며 특히 IL-1 β 로 처리한 PDLF에서 조금 더 진한 band가 관찰되었다(Figure 5A). 또한 LPS 혹은 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + dexamethasone을 처리한 PDLF에서

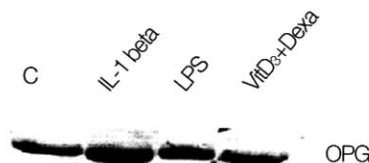


Figure 4. Western blot analysis for OPG protein secretion in PDLF culture supernatant.

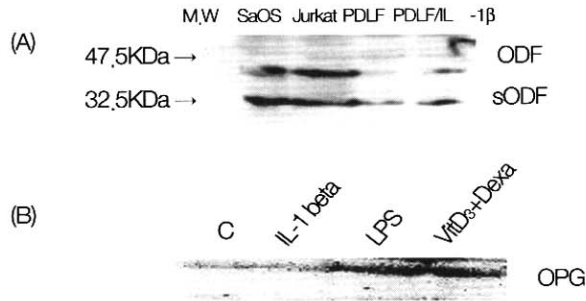


Figure 5. Western blot analysis for OPG protein production in PDLF cells.

는 대조군에 비하여 ODF 발현이 증가됨을 나타내었다(Figure 5B).

IV. 고찰

본 연구에서 사람의 치주인대 섬유아세포에서 OPG와 ODF mRNA가 발현되는지를 관찰하고자 RT-PCR을 시행하였으며, 사람의 helper T 세포주 Jurkat을 ODF mRNA 발현에 대한 positive control로 이용하였고, 사람의 osteosarcoma 세포주인 SaOs는 조골세포의 표현형을 지니고 있으므로 OPG 및 ODF mRNA에 대한 control로써 이용하였다. 결과로써 치주인대 섬유아세포에서 OPG와 ODF mRNA가 모두 발현되었으며 1,25(OH)₂D₃ + dexamethasone을 처리한 치주인대 섬유아세포에서 가장많은 OPG 및 ODF 발현을 나타내었다. 이전 연구들에서 IL-1β와 Vitamin D로 조골세포 계열 세포들을 처리할 때 OPG와 ODF mRNA 발현촉진이 보고된것³⁰⁻³¹⁾과 유사하였으며 사람 치주인대 섬유아세포가 OPG/OCIF를 생성, 분비하며 치주인대 세포에서 RANKL mRNA 표현을 나타낸다고 한 것²⁸⁻²⁹⁾과 일치한다. 이미 알려진바와 같이 OPG는 파골세포 전구세포의 분화를 억제하고 성숙 파골세포의 기능을 방해하며 ODF (RANKL)는 파골세포의 분화와 활성화를 야기하였다. 따라서 이러한 결과는 조골세포가 OPG와 ODF를 발현함으로써 파골세포를 조절하는 작용기전이 치주인대 섬유아세포에서도 적용할 수 있음을 추측할 수 있으며, 이들 유전자 발현정도의 균형에 의하여 파골세포의 분화가 조절될 수 있다고

볼 수 있다. 다양한 cytokine들은 파골세포 형성과 치조골 흡수를 촉진하고³²⁾, 이러한 cytokine들은 세균의 내독소에 의하여 자극된 염증성 세포들과 섬유아세포들에 의하여 생성되며 치주염부위에서 조직염증과 골흡수를 매개한다³³⁻³⁵⁾. 따라서 치주질환 원인균이 내는 내독소와 염증성 cytokine들이 사람 치주인대 섬유아세포에 작용하여 OPG와 ODF 발현에 영향을 미침으로써 골흡수를 유발할 수 있다고 보고 골흡수를 유발하는 대표적 염증성 cytokine인 IL-1β와 내독소 LPS로 사람 치주인대 섬유아세포를 일정 시간 자극후 OPG와 ODF 유전자 발현 양상을 관찰하였다. LPS는 그람 음성세균의 세포막을 이루고 있는 구성성분으로서 치주질환시 조직파괴의 중요한 원인요소로 알려져 있다³⁶⁾. LPS가 골조직에 미치는 영향에 관한 연구에서 골조직 배양시 45Ca의 유리를 촉진하고³⁷⁾ 부갑상선 호르몬, prostaglandin E등 골흡수 촉진물질의 작용을 상승시킨다고³⁸⁾ 하였다.

IL-1β은 골흡수에 관여하는 대표적 cytokine으로서 IL-1으로 자극받은 조골세포로부터 마우스 두개골이나 골수세포에서 파골세포의 분화를 촉진시키는 IL-6 및 GM-CSF가 생성되는 것으로 알려져 있으며³⁹⁾, 김등⁴⁰⁾은 치주인대 세포 또한 IL-1β로 자극받은 경우 IL-1β, IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현을 나타낸다고 보고하였다.

OPG의 경우 IL-1β 처리한 사람의 치주인대 섬유아세포에서는 mRNA 발현이 약간 증가하였다. 이전의 연구에서 IL-1β 처리한 경우 시간-의존적 증가양상⁴¹⁾과는 약간의 차이가 있었으며 LPS 처리한 사람 치주인대 섬유아세포에서는 mRNA 발현이 크게 감

소하였다. IL-1 β 는 강력한 골흡수 촉진인자임에도 불구하고 OPG mRNA 발현을 증가시킨다고 알려져 있으며³⁰⁾ 본 연구에서도 나타난 것으로 미루어보아 치주인대 섬유아세포에서 골흡수를 촉진시킬 뿐만 아니라 골흡수작용에 대한 negative feedback으로서 골흡수에 대한 break 역할을 하는것으로 추측할 수 있다. 한편 ODF에서는 IL-1 β 와 LPS 모두 자극 초기에 사람 치주인대 섬유아세포에서 mRNA 발현이 증가되는 양상을 나타냈으며 이는 사람의 조골세포성 세포들에서 IL-1 β 처리시 OPG ligand mRNA 발현이 증가됨을 나타낸 이전의 보고와 일치한다.

1,25(OH) $_2$ D $_3$ 는 vitamin D의 가장 강력한 대사산물로서 골에 있어서 칼슘과 인의 이동에 중요한 역할을 담당하고 있으며 골세포에서 alkaline phosphatase(ALP)를 강력하게 자극하는 것으로 알려져 있다⁴²⁾. 골에서의 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 효과에 대해 Beresford등⁴²⁾은 사람의 골세포에서 제1형 교원질과 ALP 활성을 증가시키고, Endo등⁴³⁾은 in vitro에서 골형성을 촉진한다고 하였다. 반면 Chen등⁴⁴⁾은 생쥐와 백서의 골세포 증식을 억제하는 것으로 보고하였다. 또한 김등⁴⁵⁾은 50-100ng/ml 농도에서 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 농도와 배양기간에 비례하여 치주인대 세포의 활성이 증가하였다고 하였다.

1,25(OH) $_2$ D $_3$ + dexamethasone을 처리한 사람의 치주인대섬유아세포에서는 OPG, ODF mRNA 발현이 모두 감소하였다. 이는 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 혹은 dexamethasone으로 조골세포 계열 세포들을 처리하였을 때 OPG 및 ODF mRNA 발현이 증가된다⁴⁶⁾는 이전의 보고들과는 차이가 있다. 이는 실험동물 종의 차이와 세포의 기원, 세포 배양계의 차이에 의한 것으로 생각된다. 사람의 섬유아세포에서 유리되는 OPG를 측정하기 위하여 western blot 분석을 하였는데 사람 섬유아세포 배양 상청액에서 OPG band를 관찰할 수 있었고 IL-1 β 로 처리한 사람 치주섬유아세포에서는 OPG 분비량이 증가하였고 LPS 처리시에는 약간 감소하였다.

Wada등²⁸⁾의 연구에서도 60 kDa과 120 kDa의 OPG band를 보고하였으며 이들이 파골세포 분화와 기능을 억제한다고 하였다. 또한 치주인대 섬유아세

포 세포막에 발현하는 ODF를 관찰하기 위하여 cell lysate를 western blot 분석하였는데 40 kDa 부위에서 세포막 부착 ODF band가 관찰되었고 30 kDa 부위에서 분비형 ODF band가 관찰되었으며 IL-1 β , 또는 LPS로 처리한 사람 치주인대 섬유아세포에서는 세포막 부착 단백질인 ODF의 발현이 증가하였다. 본 연구에서는 사람의 치주인대섬유아세포는 steady state에서도 OPG와 ODF를 생산함을 규명하였으며 또한 골흡수 유발인자들에 의하여 사람 치주인대 섬유아세포로부터 이들 분자의 발현이 조절됨으로써 치주질환시 나타나는 골흡수 기전에 기여하는 것으로 추측된다.

V. 결론

ODF, RANK, OPG system에 의한 골대사 조절기전이 최근 밝혀지기 시작하면서, 이들 분자들의 임상적 응용이 골다공증, 관절염, 치주질환 등과 같은 난치성 골흡수 질환의 극복에 실마리를 제공할 것으로 기대되고 있다. 치주인대섬유아세포(PDLF)는 치조골과 가장 근접한 세포로서 파골세포 형성을 유도, 혹은 억제하는 분자들을 생산하는 등, 골대사에 직간접적으로 관여한다는 증거가 오래 전부터 발표되었다. PDLF의 골대사 조절작용에 ODF, RANK, OPG system이 매개하는지 밝히고자 PDLF 세포의 OPG, ODF 유전자 발현과 단백질 생산을 RT-PCR 및 western blot 분석 방법으로 관찰하였다.

1. Steady state의 PDLF세포에서는 조골세포주인 SaOs와 마찬가지로 ODF와 OPG mRNA가 발현되었다.
2. 치주질환에서 중요한 골흡수 유발인자인 IL-1 β 를 처리하였을 경우, OPG와 ODF mRNA 발현 모두 약간씩 증가하는 것으로 관찰되었다.
3. 치주질환 원인 균주가 내는 내독소인 LPS를 처리한 PDLF에서는 OPG mRNA 발현이 감소하였으며, ODF mRNA 발현은 증가하는 것으로 관찰되었다.
4. Western 분석법에 의하면, steady state의 PDLF

배양 상청액에서 OPG 단백질이 측정되었으며, IL-1 β 로 처리한 PDLF에서는 OPG 분비량이 증가하였고 LPS 처리시에는 약간 감소하였다.

5. PDLF cell lysate를 Western blot 분석하였을 경우, SaOs, Jurkat과 마찬가지로 PDLF의 세포막 단백질 ODF와 분비형 ODF의 2 band가 40kDa, 및 32kDa 위치에서 각각 관찰되었다. IL-1 β 혹은 LPS로 처리한 PDLF에서는 세포막단백질 ODF의 생산이 대조군보다 증가되었다.

이상의 결과로부터, PDLF 세포는 steady state에서도 OPG와 ODF를 생산하며, 골흡수 유발인자들에 의하여 PDLF 세포로부터 이들 분자의 발현이 조절됨으로써, 치주질환의 골흡수 기전에 기여하는 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Chambers TJ, Hall TJ : Cellular and molecular mechanism in the regulation and function of osteoclast, vitam horm,1991;46:41-86
2. Kolliker A : Die normale resorption des knochengewebes und irhe bedeutung fur die entstehung der typischen knochenformen. F.C.W.Vogel,Leipzig 1873
3. Suda T, Takahashi N, Martin TJ : Modulation of osteoclast differentiation, Endocrinol rev,1992;13:66-88
4. Suda T, Udagawa N, Takahashi N : Cell of bone: osteoclast generation, principles of bone biology chapter, 1996;7:87-99
5. Quinn J, Elliott J, Gillespie M, Martin T : A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro, Endocrinology,1998;139
6. Takahashi N, Udagawa N, Suda T : A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function, Biochem, Biophys, Res. Commun,1999;256:449-455
7. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S : Isolation of a novel cytokine from fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis, Biochem Biophys Res Commun,1997;234:137-142
8. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N : Identity of Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and Osteoprotegerin(OPG) : a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro, Endocrinology,1998;139:1329-1337
9. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Takahashi N, Suda T, Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin /osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL, Cell Biol,1998;95:3597-3602
10. Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi M et al, Osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF) directly inhibits bone resorbing activity of isolated mature osteoclast, Biochem Biophys Res Commun,1998;251:796-801
11. Kwon B,S, Wang S, Udagawa N, Haridas V, Lee Z,H, Kim K,K, Oh K,O, Greene J, Li Y, Su J, Gentz R, Aggarwal B,B, Ni J, TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption, FASEB J,1998;12:845-854
12. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation, Cell,1998;93:165-176
13. Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JMW, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT, Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro, Biochem Biophys Res Commun, 1999; 265:144-150
14. Wong BR, Rho J, Arron J, TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family

- that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*,1997;272: 25190-25194
15. Anderson DM, Marakoskovsky E, Billingsley WL. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic cell function. *Nature*,1997;390:175-179
 16. Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun*,1998;246:199-204
 17. Burgess TL, Qian YX, Kaufman S. The ligand for osteoprotegerin(OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*,1999;145:527-538
 18. Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol*,1999;163:434-442
 19. Kong YY, Yoshida H, Saroshi I. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph node organogenesis. *Nature*,1997;397:315-323
 20. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ. Localization of RANKL(Receptor activator of NF- κ B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskkeletal tissues. *Bone*,1999;25:525-534
 21. Freeman E, Periodontium. In: Ten Cate AR, ed. *Oral histology: development,structure,and function*. St Louis:Mosby,1994:276-312
 22. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res*,1995;74:1374-1381
 23. Beertsen W, van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *J Clin Invest*,1992;89:1974-1980
 24. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Formation of afibrillar acellular cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained in vitro. *J Dent Res*,1994;73:1588-1592
 25. Giniger MS, Norton L, Sousa S, Lorenzo JA, Bronner F. A human periodontal ligament fibroblast clone releases a bone resorption inhibition factor in vitro. *J Dent Res*,1991;70:99-101
 26. Rowe DJ, Leung WW, Del Carlo DL. Osteoclast inhibition by factors from cells associated with regenerative tissue. *J Periodontol*,1996;67:414-421
 27. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H et al. Expression of osteoprotegerin(osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res*,1999;14:1486-1492
 28. Wada N, Maeda H, Tanabe K, Tsuda E, Yano K, Nakamuta H, Akaminc A. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Periodont Res*,2001;36:56-63
 29. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res*,2001; 80(3):887-891
 30. Holbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*,1998; 250:776-781
 31. Holbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin 1- β and tumor necrosis factor- α but not interleukin-6

- stimulate osteoprotegerin ligand mRNA levels in human osteoblastic cells. *Bone*,1999;24(in press)
32. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*,1995;17(suppl):87s-91s
33. Felix R, Fleisch H, Elford PR. Bone-resorbing cytokines enhance release of macrophage colony-stimulating activity by the osteoblastic cell MC3T3-E1. *Calcif Tissue Int*,1989;44:356-360
34. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res*,1991;26:230-242
35. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, Umemoto T. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun*,1995;63:3576-3581
36. Morrison DC, Cuncan Jr, J,L, and Goodman SA. In vitro biological activities of endotoxin. In *Bacterial Endotoxin*,1985;81-98
37. Hausmann E, Weingeld N, Miller W.A. Effect of lipopolysaccharide on bone resorption in tissue culture. *Calcif Tissue Res*,1972;9:272
38. Raisz LG, Nuki K, Alander CB, Craig RG. Interactions between bacterial endotoxin and other stimulators of bone resorption in organ culture. *J Periodont Res*,1981;16:1
39. Chaudhary LR, Spelsberg TC, Riggs BL. Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 and tumor necrosis factor- ; lack of regulatory by 17-estradiol. *Endocrinology*,1992;130:2528-2534
40. 김 태 선 , 유 윤 정 ,곽 월 이 ,이 승 일 , 이 종 갑 . Interleukin-1에 의하여 치주인대세포에서 유리된 cytokine이 파골세포 형성에 미치는 영향. *대한소아치과학회지*,1996;23:189-204
41. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H et al. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res*,1999;14:1486-1492
42. Beresford JN, Gallagher JA, Russell RG. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and human bone derived cells in vitro; Effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology*, 1986;199:1776-1785
43. Endo H, Kitoki M, Kawashima K, Naruchi T, Hashimoto Y. Vitamin D metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur in vitro. *Nature*,1980;286:262-264
44. Chen TL, Cone Cm, Feldman D. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and glucocorticoids on the growth of rat and mouse osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*,1983;35:806-811
45. 김성우, 박동권, 김상철. 1,25-Dihydroxyvitamin D3s가 치주인대세포활성 및 실험적 치아이동에 미치는 영향에 관한연구. *대한치과교정학회지*,1997;27(2):335-347
46. Holbauer LC, Gori F, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells; potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*,1999(in press)

Expression of Osteoprotegerin and Osteoclast Differentiation Factor in Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells

Seong-Hun Rew, Soo-Rye Heo, Hyung-Seop Kim, Kwi-Ok Oh*

Department of periodontology and Research Institute of Oral Bio-science college of Dentistry,
Chonbuk National University,
Oscotec Inc*

Recently, soluble TNF receptor homolog osteoprotegerin (OPG) and its membrane-bound ligand osteoclast differentiation factor (ODF) were found to regulate osteoclast formation and function, and bone metabolism. It is now well established that ODF acts via RANK expressed on hematopoietic osteoclast precursor cells to facilitate their differentiation to osteoclasts, and OPG prevents the formation of osteoclasts by interfering the binding of ODF and RANK. Expression of OPG and ODF was believed to be closely related to the pathogenesis of bone resorption and destruction from osteoporosis, periodontal diseases, malignant bone tumor, and arthritis.

The periodontal ligament fibroblasts (PDLF), located between the tooth and tooth socket, has been thought to play an important role in maintaining bone homeostasis of periodontal tissues. However, the exact mechanism by which bone formation and resorption are regulated by PDLF is not well understood. In this study we have prepared primary cultures of human PDLF from periodontium of malaligned tooth extracted due to orthodontic reason, and determined steady state or inflammatory signal-induced OPG and ODF expression using RT-PCR and western blot analysis. OPG and ODF mRNA and protein were expressed constitutively in the PDLF and these expression were slightly increased by osteotropic cytokine IL-1 β . Lipopolysaccharide-treated PDLF showed decrease in OPG mRNA and protein expression, and increase in ODF mRNA and protein expression. These results indicated that PDLF influence the osteoclastogenesis by OPG and ODF expression in the inflammatory situation as well as physiological condition, and thereby pathogenesis of periodontal alveolar bone destruction.

Key words : periodontal ligament, osteoprotegerin, osteoclast differentiation factor