

# cDNA Microarray를 이용한 치주인대세포와 치은섬유아세포의 유전자 발현에 대한 연구

전채영 · 박진우 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

치주치료의 목적은 조직에 확산된 염증 및 치주낭의 제거와 상실된 지지조직의 재생을 도모하는 것으로, 치주조직을 재생시키기 위해서는 치유부에 적절한 세포가 이주하여 부착되고 분화하여 신생 결합조직과 백악질, 골 조직을 형성하고 이환된 치면에 교원섬유 부착이 수반되어야 할 것이다<sup>1)</sup>.

Melcher 등<sup>2)</sup>은 치주조직재생 가능성에 대한 가설을 제안하였는데 치주수술후 치유부에 4가지 다른 형태의 세포 즉, 치은상피세포, 치은결체조직세포, 치조골세포, 치주인대세포들이 이주해 올 수 있으며, 이들 세포들에 의해 치유부의 치유양상이 다르게 나타날 수 있다고 보고하였다. Melcher의 보고이후로 상실된 치주조직 재생을 증진시키기 위한 치료방법 개발은 빠른 성장을 이루어 왔다.

조직재생 능력에 대해 많은 학자들의 연구결과, 통상적인 치주치료후 치유양상은 대부분 상피세포의 빠른 근단방향으로의 증식과 이주에 의해서 긴 접합상피 부착임이 밝혀진 바 있으며<sup>3-5)</sup>, 치주질환에 이환된 치근면을 치은결체조직과 접합시킨 후 치유양상은 치근면 흡수를 관찰할 수 있었고<sup>6,7)</sup>, 치주질환

에 이환된 치아를 발거하여 치근면에 부착된 치주인대 조직을 제거한 후 악골과 치조골에 재이식시 치근면 흡수와 골성장직이 야기됨이 보고되었다<sup>8,9)</sup>. 그리고 치은상피의 근단이주의 방지와 치은결체조직의 치근면 부착을 방지하는 조직유도재생술을 이용한 실험에서는 교원질 섬유가 삽입된 신생 백악질형성과 치조골 재생을 관찰할 수 있었다<sup>10-12)</sup>. 이상의 실험결과를 비교분석하면 치주조직 재생에 치주인대세포가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다.

이와 같이 치은섬유아세포에 의한 치유양상은 치근면 흡수를 야기하고 치주인대세포에 의한 치유양상은 신생치주조직의 형성을 통한 신부착을 야기하는 치유양상을 나타낸다는 사실은 각각의 조직에 상주하는 세포기능이 다름을 제시해 주었다. 그러므로 재생과정에서 이러한 세포들의 역할과 관계에 대해 더 깊이 이해하기 위해 치주인대세포와 치은섬유아세포를 비교하는 연구들이 많이 이루어지고 있다.

치은결합조직내에 나타나는 세포들 중 치은섬유아세포가 약 65%를 차지하며 여러 섬유들을 생성하고 무정형 세포간질인 당단백질이나 glycosaminoglycan도 생성하며 DNA 및 단백질도 생성한다. 세포의 형태는 방추형 또는 성상형이며 중앙에 난원형

\*본 논문은 2002년도 한국과학기술연구원 연구비 지원에 의해 이루어짐 jysuh@knu.ac.kr

교신저자: 서조영, 대구광역시 중구 삼덕2가 50번지, 경북대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 700-422

태의 핵을 가지고 있다. 성장이 끝난 치은조직에서는 세포가 휴지기에 놓이지만 조직의 손상, 염증, 외부자극이 있으면, 세포기능이 다시 활발해져서 각종 교원섬유 및 DNA, 단백질 등을 생성하여 손상된 결합조직 성분을 보충하며 일단 손상, 염증, 외부자극 등이 끝나면, 다시 세포는 휴지기에 돌입하게 된다<sup>13)</sup>.

치주인대의 결합조직에서는 섬유아세포가 가장 주된 세포이며 혈관을 제외하고 치주인대 분량의 50%를 차지한다. 치주인대세포는 교원질과 비교원 단백질, proteoglycan 등을 합성하고 낮은 교원섬유를 포식하며 효소성 가수분해에 의해 분해하는 능력을 가진다. 치주인대는 치조골로의 교합압 전달, 치아와 치조골 연결 등의 물리적 기능과 백악질과 골의 형성 및 흡수, 치주인대의 재형성 그리고 영양공급 및 감각기능 등을 수행한다<sup>3)</sup>.

치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장비교에 대한 연구들을 살펴보면, 먼저 생물학적 성장에 대한 비교연구들을 보면, 형태는 SEM 상에서 비슷하게 나타나는데<sup>14,15)</sup> 방추형의 섬유아세포 유사형태이며 치주인대세포가 조금 더 뾰족한 방추형을 나타낸다는 보고<sup>16)</sup>도 있다. 성장률은 비슷하거나<sup>14,15,22)</sup> 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 더 높은 성장률을 나타낸다고 보고되어 있다<sup>6)</sup>. 세포가 성긴 상태에서는 형태차이를 보이지 않지만 밀생 상태가 되면 치은섬유아세포는 평행하게 한 층으로 자라는 반면, 치주인대세포는 임의로 배열된 세포들이 여러 층을 형성하게 된다<sup>6)</sup>. 치주인대세포는 더 많은 양의 단백질과 교원질을 합성하고<sup>14)</sup> 주요 교원질 형태인 교원질 제I, III형 모두 치주인대세포에서 더 많이 발현된다고 보고되어 있다<sup>15)</sup>. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 세포골격단백질 발현이나 수축성에 대해서는 많이 알려진 바가 없으며 단지 치은섬유아세포에 비해 치주인대세포가 총 actin을 3배정도 많이 함유한다고 알려져 있고<sup>17,18)</sup>, Sappino 등<sup>19)</sup>과 Giannopoulou 등<sup>20)</sup>은  $\alpha$ -smooth muscle actin은 치주인대세포와 치은섬유아세포 모두 높게 발현되지만 smooth muscle myosin은 치주인대세포에서만 발현된다고 보고하였다.

생화학적 성장에 대한 연구들을 살펴보면 먼저 골 재생에 중요한 역할을 하는 알칼리 인산효소의 활성도가 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 더 높게 나타난다고 보고되어 있으며<sup>14,21,22)</sup>, 광물화 형성 능력에 대해 Ohshima 등<sup>22)</sup>은 치은섬유아세포와는 달리 치주인대세포가 광물화 능력을 가진다고 보고하였고, Arceo 등<sup>23)</sup>은 치주인대세포가 석회화 결절 형성이 가능하다고 보고하였다. 골 관련 단백질인 osteonectin<sup>24,25)</sup>, osteopontin<sup>26)</sup> 등이 치주인대세포에서 생산된다는 보고도 있다. Nojima 등<sup>27)</sup>은 치주인대세포가 높은 알칼리 인산효소 활성도를 보이며 bone gla protein을 합성할 수 있는 것으로 보아 치주인대세포는 조골세포나 백악아세포로 분화할 수 있으며 전형적인 조골세포 표현형을 가지고 있다고 보고하였다. 이와 같이 치주인대세포는 골아 세포 유사세포 특성을 많이 보인다고 알려져 있지만, Somerman 등<sup>28)</sup>은 치주인대세포를 배양하여 여러 약제에 의한 cyclic-AMP의 양과 단백질 합성능 및 형성되는 단백질 종류에 대하여 실험해 본 결과 치주인대세포는 조골세포와 유사한 양상을 띠고 있으나, 전형적인 조골세포의 기능을 하는 것 같지 않다는 다소 상반된 견해를 보고하였다. 치주조직재생을 위한 치료방법 개발을 위한 연구중의 하나로 최근에는 성장인자에 대한 연구가 활발하게 진행중이며, 치주인대세포와 치은섬유아세포는 모두 다양한 성장인자에 반응한다고 알려져 있다<sup>29)</sup>. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장인자에 대한 반응을 비교한 연구들을 살펴보면, Mailhot 등<sup>30)</sup>은 치주인대세포와 치은섬유아세포의 TGF- $\beta$ 1에 대한 RNA와 단백질 합성 반응을 측정한 결과 치은섬유아세포에 비해서 치주인대세포가 시간에 따라 단백질 합성증가가 더 크게 나타난다고 보고했고 Haase 등<sup>31)</sup>은 PDGF-BB와 IGF-I은 치주인대세포와 치은섬유아세포에 대해 세포분열유도효과를 가지며 치주인대세포보다 치은섬유아세포가 더 강력하게 반응한다고 보고했다.

여러 연구결과에서 나타나듯이 치주인대세포와 치은섬유아세포는 비슷한 형태를 가지는 섬유아세포임에도 불구하고 각각 상당히 독특한 특성을 나타내는 이중 세포로 여겨진다. 그러나 이러한 연구들

은 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 대해 단편적으로 보여주므로 치주인대세포와 치은섬유아세포의 전반적 유전자 발현 양상에 대해 알아보고자 microarray를 이용한 동시 유전자분석을 시행하였다.

본 연구는 microarray를 이용한 유전자 분석을 통하여 치주인대세포와 치은섬유아세포의 생체 내에서의 기능적 차이점들을 설명하여 치주조직재생에 중요한 역할을 하는 치주인대세포의 특징을 더 명확히 하며, 더 나아가 이러한 기능적 차이점들이 조직 유도재생술과 같은 치료원리와 치주재생에 미치는 영향의 중요성에 대해 이해하고자 본 실험을 시행하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. 연구재료

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco사, 미국, DMEM)을 사용하였고 fetal bovine serum(Gibco사, 미국, FBS)을 성장촉진제로 추가하였다.

Oligotex mRNA midi kit(Qiagen사, 미국), Human 3K chip, Scanarray 4000(GSI Lumonics)등을 사용하여 mRNA의 분리와 microarray hybridization, scanning을 시행하였다.

### 2. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 세포배양

교정치료를 목적으로 경북대학교병원에 내원한 환자의 발거될 제1소구치와 치은유두를 해당부위로 하고 서 등<sup>32)</sup>의 방법으로 치주인대세포와 치은섬유아세포를 분리, 배양하였다. 그리고 동일환자, 동일부위, 동일세대의 치주인대세포와 치은섬유아세포를 사용하여 실험을 시행하였다.

### 3. 총 RNA의 추출

RNA를 Chomczynski와 Sacchi<sup>33)</sup>의 방법에 따라 다

음과 같이 분리하였다.

100mm dish의 세포 층을 찬 PBS로 씻은후 변성용액(GIT:guanidinium thiocyanate)을 각 배양접시당 600 $\mu$ l씩 넣어 세포를 완전히 녹인 다음, GIT 용액을 2ml의 미량원침관에 옮기고 1/10 용량의 2M sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한후, 동량의 phenol액을 넣었다.

GIT 용액의 1/5용량의 chloroform/isoamylalcohol(49:1)을 넣고, 10초간 강하게 교반하여 15분 동안 얼음에 방치한 후, 미세원심분리기로 12000rpm에서 20분간 원침하여 상층액을 다른 미량원침관에 옮기고 같은 양의 찬 isopropanol로 섞어 -20°C에서 1시간이상 방치하였다. 그 후 다시 10분 동안 원침하여 침전물 형성을 관찰한 후, 침전물을 찬 70%알콜로 씻고, 상온에서 15분 정도 방치하여 말린후 물을 각각 50 $\mu$ l씩 넣어 녹였다. RNA 양은 UV 분광광도계로 260/280nm에서 흡광도를 잰후 양과 순도를 계산하였다.

### 4. 총 RNA로부터 poly A+ mRNA의 분리 및 형광 cDNA probe 제작

총 RNA로부터 oligotex mRNA midi kit를 이용하여 mRNA를 분리하고 UV spectrophotometer (DU530, Beckman사, 미국)로 정량하였다.

cDNA probe 제작은 DeRisi 등의 방법<sup>34)</sup>을 변형하여 이용하였다. mRNA 3 $\mu$ g에 oligo-dT(16), Superscript II reverse transcriptase (Gibco사, 미국), fluorescent nucleotide(Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP) (Amersham사, 미국)등을 가하여 역전사시키고 1.5 M sodium hydroxide 1 $\mu$ l와 30mM EDTA 1 $\mu$ l를 넣어 65°C에서 10분간 처리하여 반응을 중지시켰다. 반응액은 Microcon30 (Millipore사, 미국)을 사용해서 농축시키고 Cy3-probe와 Cy5-probe를 섞은 후 3X SSC, 0.1% SDS, 0.5 mg/ml yeast tRNA, 0.5 mg/ml poly A blocker가 되게 하였다.

### 5. Microarray

본 실험에서는 경북대학교 의과대학 면역학교실에서 제작한 Human 3K chip을 이용하였다. 제작과정을 간략히 기술하면 기질세포 유전자 은행이 보유하고 있는 3,000종의 DNA를 대상으로 C6 amine modified T3(5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3') primer와 C6 amine modified T7 (5'-GTAATAC-GACTTCACTATAGGGC-3') primer를 이용하여 PCR 시행한 후 sodium acetate와 ethanol을 첨가하여 PCR product를 침전, 건조시키고 일정량의 3X SSC에 녹였다. 이들을 amino-silane으로 코팅된 slide (CMT-GAPS™ coated slides) (Corning Inc.)에 Cartesian사의 PixSYS 5500 arrayer를 사용하여 인쇄하고 succinic anhydride를 이용한 후처리과정을 거쳐 제작되었다.

Human 3K chip slide를 10mg/ml BSA, 3.5X SSC, 0.1% SDS 용액에 넣어 50°C에서 20분간 prehybridization 한 후 증류수, isopropanol에 순서대로 헹구고 500 rpm에서 5분간 원심분리하여 slide를 건조시켰다. 준비된 probe를 99°C에서 2분간 끓이고 잠시 원심 분리하여 Human 3K chip slide에 점적하고 cover slide를 덮어 hybridization cassette (Corning Inc.)에 넣어 50°C에서 16-20시간 hybridization 하였다. hybridization 후 slide를 상온에서 0.1X SSC/0.1% SDS에 한번, 0.1X SSC에 두 번 수세하고 역시 500 rpm에서 5분간 원심분리하여 slide를 건조시켰다.

## 6. Scanning과 분석

Hybridization 결과는 Confocal laser microscope의 원리를 이용하는 Scanarray 4000(GSI Lumonics)을 사용하여 Cy3와 Cy5의 경쟁적 결합에 의한 상대적 발현 수치를 측정하고 Quantarray software (GSI Lumonics)를 이용하여 각 이미지를 합성하고 분석하여 치주인대세포와 치은섬유아세포의 유전자별 발현비율(Cy3/Cy5 비, red와 green의 intensity 비)을 결정하였다. 결과는 각각의 array에 있는 house-keeping gene인  $\beta$ -actin와 GAPDH를 이용하여 보정하고 Cy3와 Cy5의 발현비가 2.0 이상되는 것을 발현

에 유의한 차이가 있는 것으로 결정하였다.

## III. 연구 결과

본 실험에 사용된 Human 3K DNA chip은 모발 간엽세포로부터 얻어진 3063 cDNA clones을 포함하고 있으며, 1741 known genes, 1290 novel genes, 32 internal control로 구성되어 있다. 전체 3063 cDNA clones은 Table 1과 같이 분류하였다.

### 1. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 전반적 유전자 발현양상

치주인대세포와 치은섬유아세포의 전반적 유전자 발현양상은 microarray hybridization 후 Scanning에 의해 Cy3와 Cy5의 경쟁적 결합에 의한 상대적 발현 수치를 측정하고 Quantarray software를 이용하여 각 이미지를 합성하고 분석하였으며, 이러한 과정에 의해 각각 유전자들의 signal intensity를 color intensity로 전환시킨 후, 치주인대세포와 치은섬유아세포의 color intensity를 중첩시켰다(Figure 1).

치주인대세포에서 치은섬유아세포보다 더 강하게 발현되는 유전자는 전체의 13% (3063중 405개)를 차지했고, 치은섬유아세포에서 치주인대세포보다 더 강하게 발현되는 유전자는 9%(3063중 301개)이었으며, 나머지 78% 유전자들은 Cy3와 Cy5의 발현비가 2.0이하로 큰 차이를 나타내지 않았다.

Microarray 분석의 Scatter plot은 치주인대세포와 치은섬유아세포에서 각각 더 강하게 발현되는 유전자들의 분포를 전반적으로 나타내 줄 수 있다(Figure 2). 선 하방에 나타나는 점들은 치주인대세포에서 더 강하게 발현되는 유전자들이며 선 상방에 나타나는 점들은 치은섬유아세포에서 더 강하게 발현되는 유전자들이다.

치주인대세포와 치은섬유아세포의 유전자 발현 intensity 차이가 가장 큰 유전자들을 Table 1의 분류에 따라서 결과를 살펴보면, 유전자 발현에 관여하는 유전자 중 zinc finger protein 142 isolog와 cathepsin D는 치주인대세포에서 강하게 발현되었으며,

synaptosomal-associated protein은 치은섬유아세포에서 강하게 발현되었다. 세포골격 및 유주에 관여하는 유전자인 caveolin-2와 fibulin-5는 치은섬유아세포에서 강하게 발현되었다. 대사에 관여하는 유전자인 hydroxymethylglutaryl-CoA lyase는 치주인대세포에서 강하게 발현되었고 guanidinoacetate N-methyltransferase는 치주인대세포에서 강하게 발현되었다(Figure 3).

## 2. 성장인자와 성장인자 수용체 관련 유전자 발현양상

Insulin-like growth factor-2(IGF-2), IGF-2-associated protein, nerve growth factor( $\beta$ ), placental bone morphogenic protein, neuron-specific growth-associated protein 등의 성장인자와 fibroblast growth factor(FGF) receptor(cysteine-rich), acidic fibroblast growth factor(FGF) intracellular binding protein, epidermal growth factor(EGF) receptor-related gene, platelet-derived growth factor(PDGF) receptor, insulin-like growth factor(IGF) binding protein 3, latent transforming growth factor(TGF)- $\beta$  binding protein(LTBP-2) 등의 성장인자 수용체들이 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었다(Table 2).

## 3. 교원질 형태와 관련된 유전자 발현양상

치주인대세포에서는 교원질 제I( $\alpha$ 1)형, 제III( $\alpha$ 1)형, 제VI( $\alpha$ 3)형, 제VII( $\alpha$ 1)형의 발현이 치은섬유아세포보다 크게 나타났고, 치은섬유아세포에서는 교원질 제V( $\alpha$ 2)형, 제XII( $\alpha$ 1)형의 발현이 치주인대세포보다 더 크게 나타났다(Table 3).

## 4. 골아세포 관련 유전자 발현양상

치주인대세포에서 특징적으로 osteoblast specific cysteine-rich protein(OSCP)과 osteoblast specific factor 2 등이 치은섬유아세포보다 강하게 발현되었

다(Table 4).

## 5. 세포골격단백질 관련 유전자 발현양상

치주인대세포에서는  $\alpha$ -smooth muscle actin, actin binding protein, smooth muscle myosin heavy chain homolog, myosin light chain 등이 강하게 발현되는 반면, 치은섬유아세포에는  $\beta$ -actin, actin-capping protein( $\beta$  subunit), actin-related protein Arp3(ARP 3), myosin class I(myh-1c) 등이 강하게 발현되었다. 그리고 microfibril-associated glycoprotein-2(MAGP-2)도 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었다(Table 5).

세포골격 및 유주에 관여하는 유전자인 caveolin-2와 fibulin-5는 치은섬유아세포에서 더 강하게 발현되었다(Figure 3).

## IV. 총괄 및 고안

치주인대세포와 치은섬유아세포는 세포외기질 특히 교원질합성에 관여함으로써 교원질의 구조와 기능의 유지 및 치주치치 후의 치유과정에 매우 중요한데, 두 세포 모두 새로운 골, 백악질, 결합조직 부착 형성에 관여하여 치주조직 재생에 중요한 역할을 하게 된다. 재생과정에서 이러한 세포들의 역할과 관계에 대해 더 깊이 이해하기 위해 치주인대세포와 치은섬유아세포를 비교하는 연구들이 많이 이루어지고 있으며, 치주인대세포의 특성을 밝히기 위한 여러 연구들도 행해지고 있다.

본 실험에서는 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장비교 및 치주인대세포의 특징을 더 명확히 밝히기 위해 치주인대세포와 치은섬유아세포의 전반적 유전자 발현양상을 보여줄 수 있는 microarray를 이용한 동시 유전자분석을 시행하였다.

최근에 소개된 microarray를 이용한 동시 유전자 분석은 많은 범위의 유전자 발견에 빠르고 유용한 방법이며 두 가지 색의 형광물질 라벨에 의해 특이한 유전자간 발현의 양적 산출이 가능하다고 보고되어 있다<sup>35-38)</sup>.

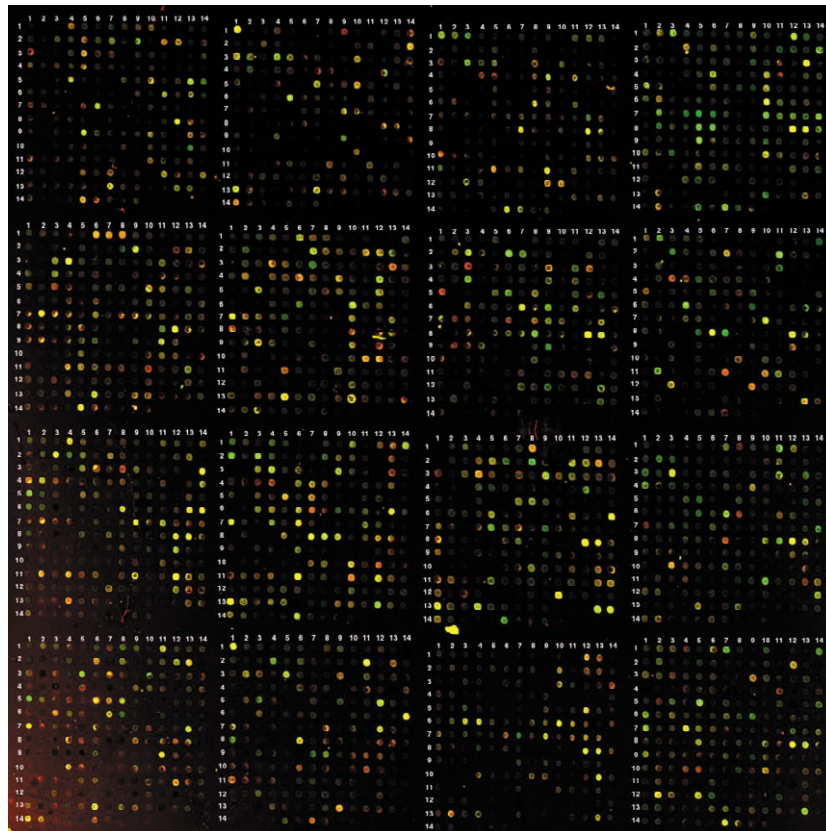


Figure 1 The Global gene expression profiling of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. A cDNA microarray was hybridized with fluorescent-labeled probes prepared from periodontal ligament cells(green) and gingival fibroblasts(red) poly(A)+ RNA. Green and red spots show relative high expression in the periodontal ligament cells and the gingival fibroblasts, respectively. Yellow spots show equal expression in both cells.

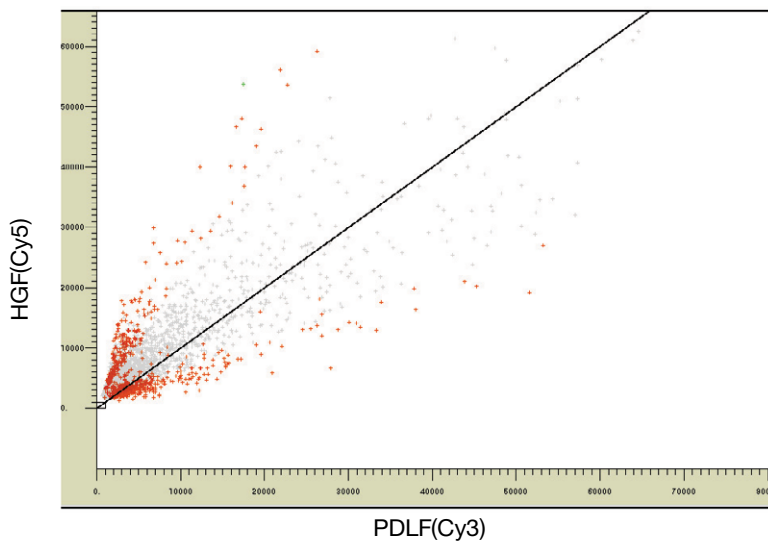


Figure 2, Scatter plots of cDNA microarray analysis. The spots that lies above the line shows genes expressed highly in the gingival fibroblasts and the spots that lies below the line shows genes expressed highly in the periodontal ligament cells.  
HGF : Human Gingival Fibroblast  
PDLF : Periodontal Ligament Fibroblast

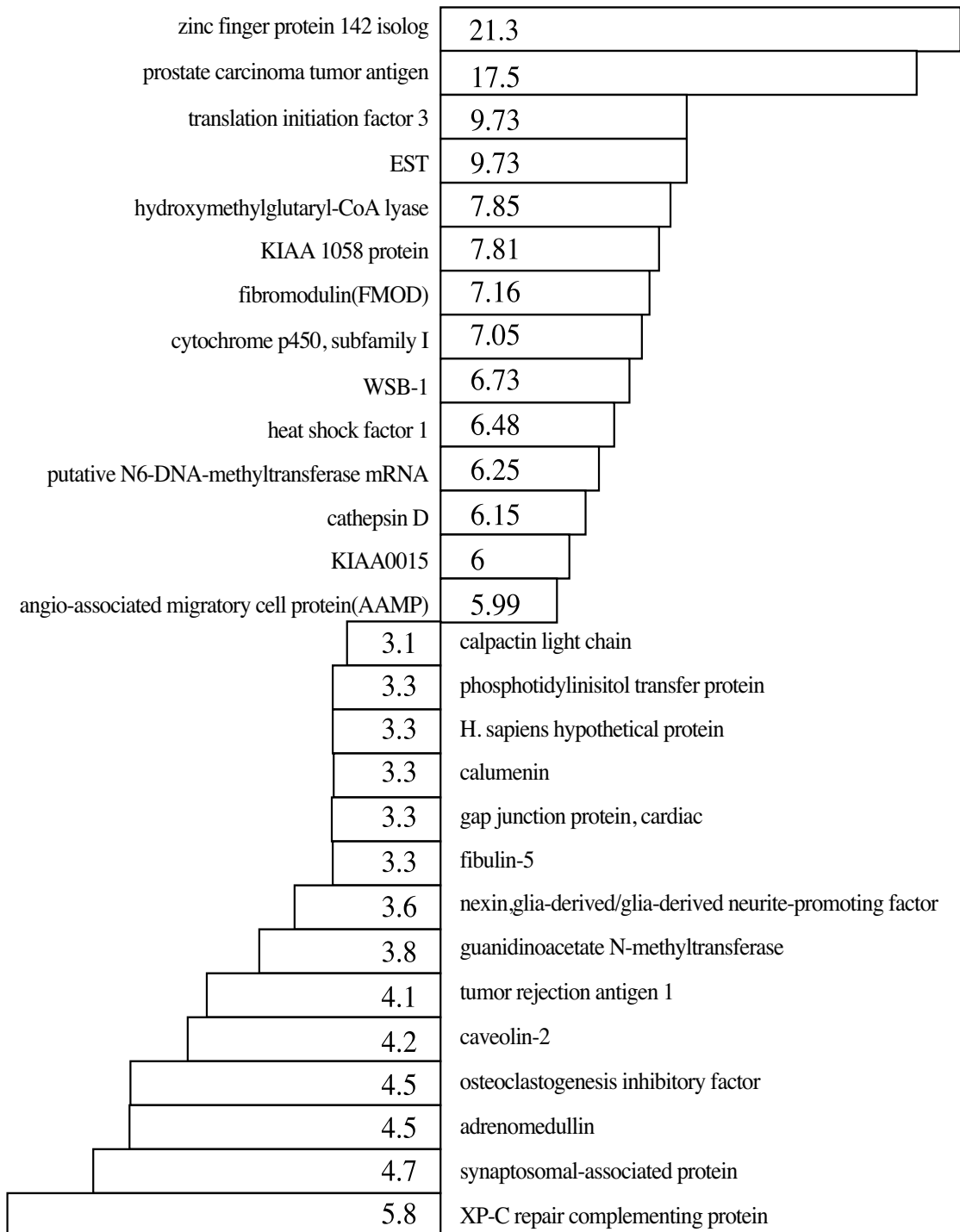


Figure 3 Largest intensity differences of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts gene expression. A right bars indicate genes expressed highly in the periodontal ligament cells than the gingival fibroblasts. A left bars indicate genes expressed highly in the gingival fibroblasts than the periodontal ligament cells.

**Table 1. Classification of 3063 mesenchymal cell derived genes.**

Classification of genes	sets of cluster
signal transduction and communication	309
Gene/protein expression	375
Cell division/DNA synthesis	73
Cell structure/motility	145
Cell/organism defence and homeostasis	59
Metabolism	221
Novel	

**Table 2. Growth factor and growth factor receptor-related gene expression patterns.**

Name	Genebank no.	G/R Ratio	R/G Ratio
insulin-like growth factor binding protein 3	M31159	5,26	0,19
fibroblast growth factor receptor, cysteine-rich	U28811	4,77	0,21
insulin-like growth factor II(IGF-2)	X07868	3,43	0,23
latent TGF-beta binding protein (LTBP-2)	Z37976	2,93	0,34
IGF-2-associated protein	X07868	2,73	0,37
fibroblast growth factor(acidic) intracellular binding protein	NM_004214	2,58	0,39
epidermal growth factor receptor-related gene	M99624	2,35	0,42
insulin-like growth factor 2(somatomedin A)(IGF2)		2,25	0,45
platelet-derived growth factor receptor	J03278	2,21	0,45
nerve growth factor, beta	X52599	2,2	0,46
placental bone morphogenic protein	U588323	2,1	0,48
G/R ratio : Green intensity/Red intensity			
R/G ratio : Red intensity/Green intensity			

**Table 3. Collagen-related gene expression patterns.**

Name	Genebank no.	G/R Ratio	R/G Ratio
collagen,type V, alpha 2	X047758	0,41	2,42
collagen, type XII, alpha 1	U73778	0,4	2,53
collagen, type I, alpha 1	X55525	2,74	0,37
collagen, type III, alpha 1	X14420	3,2	0,31
collagen, type VI, alpha 3	X52022	2,25	0,44
collagen type VII, alpha 1	L02870	2,99	0,33

**Table 4. Osteoblast-related gene expression patterns.**

Name	Genebank no.	G/R Ratio	R/G Ratio
osteoblast specific cysteine-rich protein	AB008375	2,88	0,35
biglycan	J04599	2,79	0,36
osteoprotegerin(OPG)	U94332	0,39	2,57
decorin		0,53	1,87



Table 5. Cytoskeletal proteins-related gene expression patterns.

Name	Genebank no.	G/R Ratio	R/G Ratio
actin, alpha, smooth muscle	X13839	3.02	0.33
actin binding protein	U09873	2.8	0.36
myosin, light chain, smooth muscle	M22918	2.27	0.44
myosin heavy chain homolog	U53445	2.84	0.35
microfibril-associated glycoprotein-2	U37283	2.14	0.47

Microarray를 이용하여 동일환자, 동일세대의 치주인대세포와 치은섬유아세포의 3063개 유전자 발현양상을 비교해 본 결과, 치주인대세포와 치은섬유아세포는 비슷한 형태를 가지는 섬유아세포임에도 불구하고 상당히 다른 유전자 발현양상을 나타내었으며 두세포의 유전자 발현양상을 동시에 쉽게 비교할 수 있었다. 또한 본 실험의 결과는 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 대한 많은 연구들의 결과와 일치하는 것으로 보아 microarray를 이용한 유전자 분석은 상당히 정확한 유전자 분석방법이라고 여겨진다.

먼저 성장인자와 성장인자 수용체 관련 유전자 발현양상을 비교해 보면, IGF-2 (Somatomedin A), IGF-2-associated protein, nerve growth factor( $\beta$ ), placental bone morphogenetic protein, neuron-specific growth-associated protein 등의 성장인자와 FGF receptor(cysteine-rich), acidic FGF intracellular binding protein, EGF receptor -related gene, PDGF receptor, IGF binding protein 3, latent TGF- $\beta$  binding protein(LTBP-2) 등의 성장인자 수용체들이 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었다.

성장인자는 세포의 유사분열, 화학주성, 분화, 대사, 증식, 이주와 같은 중요한 세포과정을 조절함으로써 조직재생과 치유에 관여하게 된다<sup>39,40</sup>. 치주조직 재생과 치유에도 다양한 성장인자들이 관여되어 있다는 것은 널리 알려진 사실이며, 치주인대세포의 활성화에 영향 미치는 성장인자 중 최근 가장 많이 연구되고 있는 것으로는 PDGF-BB, TGF- $\beta$ , bFGF, EGF, IGF-I, cementum-derived growth factor(CGF),

bone morphogenetic protein-7(BMP-7)(osteogenic protein-1)등이 있다<sup>40</sup>.

임상전단계의 동물실험에서 치주조직 치유에 미치는 성장인자의 영향에 대한 연구 중, 초창기에 PDGF와 IGF-I 병용에 가장 관심이 모아졌으며, 생체 실험에서 새로운 골, 백악질, 치주인대 형성이 증가되었다고 보고되어 있다<sup>41-43</sup>. PDGF와 Dexamethasone의 병용 역시 상당한 새로운 골 형성과 부착수준 증가를 가지고 왔다고 보고되었으며<sup>44</sup> 최근에는 PDGF/GTR 병용치료에 의해 상당한 양의 새로운 골 형성과 부착구조의 증가를 가지고 올 수 있다고 보고된 바 있다<sup>45,46</sup>. PDGF/IGF-I의 임상 인체사용은 Howell 등<sup>47</sup>에 의해 처음 시도되었으며 43.2% 골결손부 치유의 결과를 얻을 수 있었다고 보고되었다.

이와 같이 성장인자 주입시 생체실험에서 상실된 치주조직의 재생이 야기된 것으로 보아 본 연구결과에서 나타난 바와 같이 다양한 성장인자 수용체들이 치주인대세포에 많이 존재함으로써 위의 양상이 일어날 수 있을 것이라고 유추해 볼 수 있다.

교원질 형태에 관련된 유전자 발현양상을 보면, 치주인대세포는 교원질 제I( $\alpha$ 1)형, 제III( $\alpha$ 1)형, 제VI( $\alpha$ 3)형, 제VII( $\alpha$ 1)형의 발현이 치은섬유아세포보다 크게 나타났고, 치은섬유아세포는 교원질 제V( $\alpha$ 2)형, 제XII( $\alpha$ 1)형의 발현이 치주인대세포보다 더 크게 나타났다. Hou와 Yaeger 등<sup>15</sup>은 같은 배양 조건 하에서 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 collagen type I과 fibronectin의 발현이 더 크게 나타남을 관찰하고 이는 치은섬유아세포보다 치주인대세포가 생합성적 활성도가 더 크다는 사실을 나타낸

다고 보고했는데 본 연구결과에서도 교원질 제I, III형 모두 치주인대세포에서 더 많이 발현되었다. 교원질 제I, III형은 섬유아세포의 주요 교원질 형태이며 치주인대세포와 치은섬유아세포의 교원질 발현 양상이 다르다는 사실로써 두 세포의 이종성을 설명할 수 있고, 또한 치주인대세포에서 교원질 제I, III형의 발현이 더 크다는 사실로써 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 재생능력이 우수하다고 유추할 수 있다.

교원질 제I, III형은 치주인대와 치은결합조직의 발생동안 주요성분이며, 교원질 제XII형은 치아맹출후 성숙한 형태의 치주인대와 치은결합조직에서 발견된다<sup>48)</sup>. 특히 교원질 제XII형의 발현은 치주인대 및 치은결합조직의 교원 원섬유 배열 즉, 이전에 합성된 교원질 제I형 원섬유의 성숙과 조직화와 연관되어 있다고 알려져 있다<sup>49)</sup>. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 교원질 제XII형 발현차이에 대해서는 아직 확실하게 밝혀진 바가 없으나, 교원질 제XII형의 발현은 교원 원섬유의 배열과 연관되어 있으므로 교원질 제XII형이 치주인대세포보다 치은섬유아세포에서 더 강하게 발현된 실험결과로부터 치주인대세포보다 치은섬유아세포가 교원 원섬유 배열 및 성숙이 더 조직화되어 있다고 생각해 볼 수 있다. 이번 실험 결과에서 치은섬유아세포는 다소 낮은 교원질 제I형의 함유와 다소 높은 교원질 제XII형 함량을 가지므로 매우 조직적인 섬유 배열과 매우 발달된 Sharpey's fiber를 가진다고 여겨진다.

생체 외에서 세포의 골아 세포 유사특징을 평가하는데 사용되는 기준으로는 높은 알칼리 인산효소 활성도, 부갑상선에 대한 cAMP 생성 증가, 석회화 결절의 형성, 다량의 교원질 제I형 합성, osteonectin 등의 골 관련 단백질의 생성 등을 들 수 있다<sup>23)</sup>. Arceo 등의 연구<sup>23)</sup>에 의하면 치은섬유아세포와는 달리 치주인대세포는 높은 알칼리 인산효소수준을 나타냈고, 석회화 결절의 형성을 보였는데, 이는 골아 세포 유사세포의 특징이라고 보고하였다. Somerman 등<sup>28)</sup>의 치주인대세포의 특징에 대한 연구에서 치주인대세포는 골아 세포 유사양상을 나타내어 골 관련 단백질, osteonectin을 생산하며 bone proteoglycan

I(biglycan)에 대한 mRNA level이 감지된다고 보고하였다. 이번 실험에서도 치주인대세포에서 특징적으로 osteoblast specific cysteine-rich protein(OSCP)과 osteoblast specific factor 2 등이 치은섬유아세포보다 강하게 발현되었으며, 치은섬유아세포와는 달리 골아 세포 유사세포 특징을 가진다고 생각된다.

이와 같이 치주인대세포는 골아 세포 유사특징을 나타내지만, Somerman 등<sup>28)</sup>은 치주인대세포는 조골세포와 유사한 양상을 띠고 있으나, 전형적인 조골세포의 기능을 하는 것 같지 않다고 보고하였고, Ogata 등<sup>16)</sup>의 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장 비교연구에서도 치주인대세포는 높은 알칼리인산효소 활성도를 나타내는 등 치은섬유아세포와는 상당히 다른 특징을 나타내지만, 석회화 결합조직에 특징적 단백질인 biglycan, decorin, osteocalcin, BSP 등의 발현에 대한 결과를 볼 때, 치은섬유아세포와 같이 biglycan, decorin mRNA를 발현하는 반면, osteocalcin, BSP mRNA는 발현하지 않으므로 골아 세포와는 다른 표현형을 나타내는 것으로 보고한 바 있다. 이번 실험에서 biglycan은 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었고, decorin은 치은섬유아세포에서 더 강하게 발현되었다.

세포골격단백질은 교원질 수축력에 영향 미치고 기계적 힘에 의한 세포의 변형이 발생할 때 세포 형태변화전에 빠른 반응을 나타내게 되며 이러한 현상은 세포종류에 따라 다르게 나타난다고 보고되어 있다<sup>18)</sup>. 즉, 세포종류에 따라 세포골격단백질 발현이 다르게 나타나는데, Beertsen 등<sup>17)</sup>과 Pender와 McCulloch 등<sup>18)</sup>은 치은섬유아세포에 비해 치주인대세포는 총 actin을 3배정도 많이 함유한다고 보고하였고, Sappino 등<sup>19)</sup>은 근육세포의 2가지 독특한 단백질인 smooth muscle actin과 myosin의 발현에 치주인대세포와 치은섬유아세포가 차이를 나타내는데, 치주인대세포와 치은섬유아세포 모두 많은 양의  $\alpha$ -smooth muscle actin을 발현하지만 smooth muscle myosin은 치주인대세포에서만 발현된다고 보고하였다. Giannopoulou 등<sup>20)</sup>도 Sappino 등의 연구결과와 동일하게 smooth muscle actin은 치주인대세포와 치은섬유아세포 모두 발현되나 smooth muscle

myosin은 치주인대세포에서만 발현된다고 보고하였다. 본 실험에서 세포골격단백질의 발현양상에 대한 결과도 이와 유사하게 나타났는데, 치주인대세포에서는  $\alpha$ -smooth muscle actin, actin binding protein, smooth muscle myosin heavy chain homolog, myosin light chain등이 강하게 발현되는 반면, 치은섬유아세포에는  $\beta$ -actin, actin-capping protein( $\beta$  subunit), actin-related protein Arp3(ARP 3), myosin class I(myh-1c) 등이 강하게 발현되었다. 그리고 microfibril-associated glycoprotein-2(MAGP-2)도 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었다.

Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor(OPG/OCIF)는 tumor necrosis factor(TNF) receptor superfamily의 새로운 구성멤버로서 파골 세포의 활성도를 억제함으로써 골 흡수를 억제하는 기능을 가지고 있다<sup>50,51</sup>). 폐, 심장, 신장, 태반과 같은 다양한 조직들이 OPG/OCIF transcripts를 가지고 있으며<sup>50,52</sup>), 세포수준에서는, bone marrow stromal cells, osteoblastic cells, osteosarcoma cells, IMR-90 등이 OPG/OCIF mRNA를 발현한다고 알려져 있다<sup>52-55</sup>). 이번 실험에서 OPG/OCIF는 치주인대세포보다 치은섬유아세포에서 더 강하게 발현되었는데, 최근 Sakata 등<sup>56</sup>)은 OPG/OCIF가 치은섬유아세포, 치주인대세포, 치수세포등의 치아간엽세포들에 존재함을 발견하고 이들 세포들이 OPG/OCIF를 분비하여 파골 세포와 파치세포의 활성도를 억제함으로써 치조골, 백악질, 상아질과 같은 치아 경조직의 흡수를 조절하는 역할을 한다고 보고한 바 있으나, 치주인대세포와 치은섬유아세포의 OPG/OCIF 발현 정도차이에 대해서는 언급하지 않았다.

이상의 결과와 같이 치주인대세포와 치은섬유아세포는 비슷한 형태를 가지는 섬유아세포임에도 불구하고 상당히 다른 유전자 발현양상을 나타내는 이종의 세포들이다. 본 실험에서 다수의 성장인자와 성장인자 수용체 관련 유전자는 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었으며 이러한 결과로부터 성장인자 주입시 상실된 치주조직의 재생이 야기된 많은 실험들의 결과를 설명해 줄 수 있고, 치주인대세포에서 특징적으로 osteoblast spe-

cific cysteine-rich protein이 강하게 발현되어 골아세포 유사세포 특징을 나타내었으므로 이러한 결과로부터 치주조직의 재생에 치주인대세포가 중요한 역할을 한다는 주장을 뒷받침해 줄 수 있다.

치주인대세포와 치은섬유아세포의 성상비교에 대해서는 여러 연구들이 발표되어 있으나, 두 세포의 유전자 발현양상에 대한 연구는 미미한 상태이다. 본 연구결과에서 치주인대세포와 치은섬유아세포는 비슷한 형태를 가지는 섬유아세포임에도 불구하고 상당히 다른 유전자 발현양상을 나타내었다. 앞으로 치주인대세포와 치은섬유아세포에서 발현양상이 다른 유전자에 대한 계속적인 연구가 진행되어야 할 것이며, 이러한 연구는 치주조직재생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있지만 그 기능 및 특성에 대해 아직 확실하게 밝혀져 있지 않은 치주인대세포의 성질을 규명하는데 많은 도움을 줄 것으로 기대된다.

## V. 결론

치주조직의 재생에는 치주인대세포가 중요한 역할을 할 것이라고 알려져 있으며, 치은섬유아세포 역시 결합조직부착을 형성하여 치주조직 재생에 관여하게 된다. 재생과정에서 이러한 세포들의 역할과 관계에 대해 더 깊이 이해하기 위해 치주인대세포와 치은섬유아세포를 비교하는 연구들이 많이 이루어지고 있으며, 치주인대세포의 특성을 밝히기 위한 연구들도 행해지고 있다. 그러나, 치주인대세포와 치은섬유아세포의 유전자 비교에 대해서는 연구가 미미한 상태이므로, 치주인대세포와 치은섬유아세포의 microarray를 이용한 유전자 분석을 통하여 치주인대세포와 치은섬유아세포의 기능적 차이점들을 설명하고, 치주조직재생에 중요한 역할을 하는 치주인대세포의 특징을 더 명확히 하기 위해 본 실험을 시행하였다.

동일환자, 동일부위, 동일세대의 치주인대세포와 치은섬유아세포로부터 총 RNA를 추출하고 다시 mRNA를 분리시켜, 3063개 유전자 microarray hybridization을 해 본 결과, 치주인대세포와 치은섬

유아세포는 비슷한 형태를 가지는 섬유아세포임에도 불구하고 상당히 다른 유전자 발현양상을 나타내었다.

치주인대세포에서 치은섬유아세포보다 더 강하게 발현되는 유전자는 전체의 13% (3063중 405개)를 차지했고, 치은섬유아세포에서 치주인대세포보다 더 강하게 발현되는 유전자는 9%(3063중 301개)이었으며, 나머지 78% 유전자들은 Cy3와 Cy5의 발현비가 2.0이하로 큰 차이를 나타내지 않았다.

다수의 성장인자와 성장인자 수용체 관련 유전자는 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었으며 이러한 결과로부터 성장인자 주입 시 상실된 치주조직의 재생이 야기된 많은 실험들의 결과를 설명해 줄 수 있고, 치주인대세포에서 특징적으로 osteoblast specific cysteine-rich protein이 강하게 발현되어 골아 세포 유사세포 특징을 나타내었으므로 이러한 결과로부터 치주조직의 재생에 치주인대세포가 중요한 역할을 한다는 주장을 뒷받침해 줄 수 있다.

치주인대세포와 치은섬유아세포는 비슷한 형태를 가지는 섬유아세포임에도 불구하고 상당히 다른 유전자 발현양상을 나타내는 이종의 세포들이다.

앞으로 치주인대세포와 치은섬유아세포에서 발현양상이 다른 유전자에 대한 계속적인 연구가 진행되어야 할 것이며, 이러한 연구는 치주인대세포의 성질을 규명하는데 많은 도움을 줄 것으로 기대된다.

## VI. 참고 문헌

- 권영혁외 : 치주과학, 군자출판사, 1996, 612
- Melcher AH : On the repair potential of periodontal tissue, J Periodontol 47; 256-260, 1976
- Yukna RA : A clinical & histologic study of healing following the excisional new attachment procedure in rhesus monkeys, J Periodontol 47; 701-709, 1976
- Caton J, Nyman S : Histometric evaluation of periodontal surgery : I. The modified Widman flap procedure, J Clin Periodontol 7; 212-223, 1980
- Caton J, Nyman S, Zander H : Histometric evaluation of periodontal surgery. : II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures, J Clin Periodontol 7; 224-231, 1980
- Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S : Healing following implantation of periodontitis - affected roots into gingival connective tissue, J Clin Periodontol 7; 394-401, 1980
- Karring T, Nyman S, Lindhe J, Sirirat M : Potentials for root resorption during periodontal wound healing, J Clin Periodontol 11; 41-52, 1984
- Karring T, Nyman S, Lindhe J : Healing following implantation of periodontitis -affected roots into bone tissue, J Clin Periodontol 7; 96-105, 1980
- Nyman S, Houston F, Sarhed G, Lindhe J, Karring T : Healing following reimplantation of teeth subjected to root planing and citric acid treatment, J Clin Periodontol 12; 294-305, 1985
- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J : The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey, J Clin Periodontol 9; 257-265, 1982
- Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration, J Clin Periodontol 11; 494-503, 1984
- Caffesse RG, Domirguez LE, Nasjleti CE, Castelli WA, Morisson EC, Smith BA : Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration, J Periodontol 61; 45-50, 1990
- Bartold MP, Narayanan SA : Biology of the periodontal connective tissues, Quintessence, 1998, p.173-195
- Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, J Dent Res 67(1); 66-70, 1988

15. Hou LT, Yaeger JA : Cloning & Characterization of Human gingival & periodontal ligament fibroblasts, *J Periodontol* 64; 1209-1218, 1993
16. Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H : Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells, *J Periodontol* 66(12); 1025-31, 1995
17. Beertsen W, Everts V, Van den Hooff A : Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption, *Arch Oral Biol* 19; 1087-1098, 1974
18. Pender N, McCulloch CAG : Quantitation of actin polymerisation in two human fibroblast subtypes responding to mechanical stretching, *J Cell Sci* 100; 187-193, 1991
19. Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G : Differentiation repertoire of fibroblastic cells. : Expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations, *Lab Invest* 63; 144-161, 1990
20. Giannopoulou C, Cimasoni G : Functional characteristics of gingival & periodontal ligament fibroblasts, *J Dent Res* 75(3); 895-902, 1996
21. Kawase T, Sato S, Miake K, Saito S : Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells, *Adv Dent Res* 2; 234-239, 1988
22. Ohshima M, Kuwata F, Otsuka K, Saito R, Sato K, Shioji S. : Alkaline phosphatase activities of cultured human periodontal ligament cells, *J Nihon Univ Sch Dent* 30; 209-217, 1988
23. Arceo N, Sauk, JJ Moehring J, Foster RA, Somerman MJ : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro, *J Periodontol* 62; 499-503, 1991
24. Wasi S, Otsuka K, Yao KL, Tung PS, Aubin JE, Sodek J : An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts, *Can J Biochem Cell Biol* 62; 470-478, 1984
25. Liao H, Brandsten C, Lundmark C, Christersson C, Wurtz T : Osteonectin RNA and collagen alpha 1(I) RNA in the developing rat maxilla, *Eur J Oral Sci* 106; 418-423, 1998
26. Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG : Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium, *Cell Tissue Res* 285; 491-, 1996
27. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegaw K : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts, *J Periodont Res* 25; 179-185, 1990
28. Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ : Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro, *Archs Oral Biol* 35; 241-247, 1990
29. Nishimura F, Terranova VP : Comparative study of the chemotactic response of periodontal ligament cells & gingival fibroblasts to polypeptide growth factors, *J Dent Res* 75; 986-92, 1996
30. Mailhot JM, Schuster GS, Garnick JJ, Hanes PJ, Lapp CA, Lewis JB : Human periodontal ligament & gingival fibroblast response to TGF- $\beta$ 1 stimulation, *J Clin Periodontol* 22; 679-685, 1995
31. Haase HR, Clarkson RW, Waters MJ, Bartold PM : Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan synthesis by human periodontal fibroblasts, *J Cell Physiol* 174; 353-, 1998
32. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교. *대한구강생물학회지*. 15; 14-28, 1991
33. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, 162; 156-159, 1990

34. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM : Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer, *Nat Genet* 14; 457-460, 1996
35. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO : Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* 20; 467-470, 1995
36. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW : Parallel human genome analysis : Microarray-based expression monitoring of 1000 genes, *Biochemistry* ; 10614-10619, 1996
37. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL : Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, *Nature Biotechnology* 14 ; 1675-1680, 1996
38. DeRisi JL, Lyer VR, Brown PO : Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, *Science* 278 ; 680-686, 1997
39. Lynch SE, Gustavo Ruiz de Castilla, Williams RC, Kiritsu CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN : The Effect of short-term application of a combination of PDGF & IGF on periodontal wound healing, *J Periodontol* 62; 458-467, 1991
40. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration, *J Periodontol* 67; 545-553, 1996
41. Lynch SE, Williams RC, Polson AM : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration, *J Clin Periodontol* 16; 545-548, 1989
42. Rutherford RB, Niekirash CE, Kennedy JE, Charette MF : Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys, *J Periodont Res* 27; 285-290, 1992
43. Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE : Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal therapy : Results following a single administration of PDGF/IGF-I, *J Periodontol* 65; 1158-1168, 1994
44. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy ME, Tucker MM, Charette MF : Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys, *J Clin Periodontol* 20; 537-544, 1993
45. Park JB, Matsuura M, Han KY : Periodontal regeneration in Class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor, *J Periodontol* 66; 462-477, 1995
46. Cho MI, Lin WL, Genco RJ : Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy, *J Periodontol* 66; 522-530, 1995
47. Howell TH, Fiorellini J, Paquette D, Offenbacher S, Antoniades H, Lynch S : Evaluation of platelet-derived growth factor-BB/purified insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease, *J Dent Res* 74; 253, 1995
48. Karimbux NY, Rosenblum ND, Nishimura I : Site-specific expression of collagen I & XII mRNAs in the rat periodontal ligament at two developmental stages, *J Dent Res* 71(7); 1355-62, 1992
49. Karimbux NY, Ramamurthy NS, Golub LM, Nishimura I : The expression of collagen I & XII mRNAs in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats : the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. *J Periodontol* 69(1); 34-40, 1998
50. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Boyle WJ :

- Osteoprotegerin : A novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell* 89; 309-310, 1997
51. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliot R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Boyle WJ. : Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation, *Cell* 93; 165-176, 1998
  52. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki S, Higashio K. : Identity of OCIF and OPG. : A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro, *Endocrinology* 139; 1329-1337, 1998
  53. Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljungdhal S, Ljunggren O. : Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells, *Biochem Biophys Res Commun* 247;338-341, 1998
  54. Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljungdhal S, Ljunggren O. : Tumor necrosis factor- $\alpha$  and - $\beta$  upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells, *Biochem Biophys Res Commun* 248; 454-457, 1998
  55. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S : Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage 2, and cytokines, *Biochem Biophys Res Commun* 250; 776-781, 1998
  56. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suganaka H, Kurihara H : Expression of osteoprotegerin(osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cell, *J Bone Miner Res* ; 14 ; 1486-92, 1999

## A Comparative Study of Gene Expression Patterns of Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts using the cDNA Microarray

Chai-Young Jeon, Jin-Woo Park, Jae-Mok Lee, Jo-Young Suh

Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyungpook National University

Periodontal ligament(PDL) cells have been known as playing an important roles in periodontal regeneration and gingival fibroblasts are also important to periodontal regeneration by forming connective tissue attachment. There were rare studies about the gene expression patterns of PDL cells and gingival fibroblasts, therefore in this study, we tried cDNA microarray-based gene expression monitoring to explain the functional differences of PDL cells and gingival fibroblasts in vivo and to confirm the characteristics of PDL cells.

Total RNA were extracted from PDL cells and gingival fibroblasts of same person and same passages, and mRNA were isolated from the total RNA using Oligotex mRNA midi kit(Qiagen) and then fluorescent cDNA probe were prepared. And microarray hybridization were performed.

The gene expression patterns of PDL cells and gingival fibroblasts were quite different. About 400 genes were expressed more highly in the PDL cells than gingival fibroblasts and about 300 genes were more highly expressed in the gingival fibroblasts than PDL cells.

Compared growth factor- and growth factor receptor-related gene expression patterns of PDL cells with gingival fibroblasts, IGF-2, IGF-2 associated protein, nerve growth factor, placental bone morphogenic protein, neuron-specific growth- associated protein, FGF receptor, EGF receptor-related gene and PDGF receptor were more highly expressed in the PDL cells than gingival fibroblasts.

The results of collagen gene expression patterns showed that collagen type I, type III, type VI and type VII were more highly expressed in the PDL cells than gingival fibroblasts, and in the gingival fibroblasts collagen type V, XII were more highly expressed than PDL cells.

The results of osteoblast-related gene expression patterns showed that osteoblast specific cysteine-rich protein were more highly expressed in the PDL cells than gingival fibroblasts.

The results of cytoskeletal proteins gene expression patterns showed that  $\alpha$ -smooth muscle actin, actin binding protein, smooth muscle myosin heavy chain homolog and myosin light chain were more highly expressed in the PDL cells than gingival fibroblasts, and  $\beta$ -actin, actin-capping protein( $\beta$  subunit), actin- related protein Arp3(ARP) and myosin class I(myh-1c) were more highly expressed in the gingival fibroblasts than PDL cells.

Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor(OPG/OCIF) was more highly expressed in the PDL cells than gingival fibroblasts.



According to the results of this study, PDL cells and gingival fibroblasts were quite different gene expression patterns though they are the fibroblast which have similar shape. Therefore PDL cells & gingival fibroblasts are heterogeneous populations which represent distinct characteristics. If more studies about genes that were differently expressed in each PDL cells & gingival fibroblasts would be performed in the future, it would be expected that the characteristics of PDL cells would be more clear.