

분자생물학을 이용하여 복제노화된 사람치주인대섬유모세포의 세포학적 연구

1,5 · 조일준¹ · 박주철^{2,5} · 국중기^{3,5} · 김홍중^{4,5} · 장현선^{1,5*}

¹조선대학교 치과대학 치주과학 교실

²조선대학교 치과대학 구강조직학 교실

³조선대학교 치과대학 구강생화학 교실

⁴조선대학교 치과대학 구강해부학 교실

⁵조선대학교 치과대학 구강생물학연구소

I.

주로 성인을 대상으로 하는 치주질환은 삶의 고통화와 더불어 더욱 더 관심의 대상이 되고 있으며, 치주질환이 진행된 후 치주 치료를 받기 보다는 치주질환 진행 전에 미리 관리하여 치주 상태를 유지하기를 선호한다. 치주조직의 치유는 조절인자, 세포, 비계를 필요로 하는데, 사람치주인대섬유모세포는 골모세포, 백악모세포, 치주인대섬유모세포 등으로 증식, 분화, 이주할 수 있기 때문에 치주조직의 치유에 중요한 역할을 담당하고 있다¹⁻⁵⁾.

그러나 사람이 나이를 먹으면 늙는 것처럼 사람치주인대섬유모세포는 배양과정에서 공여자의 연령에 관계없이 adult clones이 되면 변함없이 노화로 진행되고, 다른 결체조직내의 섬유모세포들보다 life-span이 더 짧음이 확인됨으로써⁶⁾, 치주조직의 치유에 중요한 치주인대섬유모세포가 치은 등 다른 섬유

모세포보다 더 빨리 노화로 진행될 수 있는 가능성을 시사한다. 젊은 사람과 늙은 사람의 치주인대섬유모세포의 증식률에 관한 또다른 연구에서, 늙은 사람의 경우 세포는 노화과정을 통해 증식되기는 섬유화된 조직을 형성하기 때문에 창상 치유능력이 손상될 수 있다고 보고되고 있다⁷⁾.

West 등⁸⁾은 피부가 노화되는 증거로 진피의 비박과 교원섬유의 파괴를 제안하였는데, 섬유아세포가 노화되면 collagenase가 과발현되고 collagenase inhibitors가 저발현되기 때문이라고 보고하였다. 치주조직내 세포외기질(Extracellular matrix, ECM)의 개조(remodeling)현상은 matrix metalloproteinase(MMP)에 의한 용해와 tissue matrix metalloproteinase inhibitor(TIMF)에 의한 MMP의 억제, 즉 세포외기질 분자들의 균형을 통해서 조절되는데, 노화가 진행되면 불균형이 초래되어 조직의 파괴 및 수복능력의 결손을 야기할 수 있다⁹⁾.

* “이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-002 -E00148).”

*교신저자: 장현선 광주광역시 동구 서석동 421번지 조선대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 501-759,
e-mail: periojang@chosun.ac.kr

Martin 등¹⁰⁾은 피부에 있는 섬유모세포의 노화에 관한 연구에서, 마지막 세대가 되었을때에도 Fibronectin은 발현되지만 Type I collagen은 발현되지 않았다고 보고하면서, Type I collagen은 생성되는 즉시 세포내에서 자체분해되기 때문임을 보고함으로써 Fibronectin과 Type I collagen를 노화의 증거로 활용할 수 있음을 시사하였다. Chung 등¹¹⁾은 사람의 피부가 노화되면 collagen의 합성은 감소하는 반면, MMP의 발현은 증가한다고 보고하였다.

치주인대 섬유모세포에서 선택적으로 발현되는 유전자 중 하나인 PDLs22(periodontal ligament specific)는 백악질과 치조골의 초기 분화에 중요한 역할을 하며, 치아이동시 치주인대세포들의 개조와 재생에 또한 중요한 역할을 할 수 있음이 보고되었다¹²⁾. 중증 이상의 치주염에서는 치아의 동요를 수반하는 경우가 많으며, 치주염은 대부분 30대 이후의 성인에서 발생하므로 치주인대섬유모세포는 노화과정을 겪고 있다고 가정할 수 있다. 이에 노화과정에 따른 PDLs22의 발현 양상을 관찰하는 것은 노화와 조직 치유능력의 비교를 위해 의의가 있다고 사료된다.

이에 본 연구의 목적은 치주조직 치유에 필수적인 사람치주인대섬유모세포의 노화과정에 따른 세포의 형태학적 변화를 관찰하고, 노화와 관련된다고 보고된 여러 유전자들의 발현 양상을 비교하고자 한다.

II. 및 재료

1. 치주인대섬유모세포의 배양

사람치주인대섬유모세포를 일차 배양한 후 순차적으로 복제노화(19세, 27세 환자)를 유도하였다.

19세 환자는 21세대에서, 27세 환자는 18세대에서 세포의 사멸 소견이 관찰되어 마지막 세대로 설정하였다.

19세 환자는 2, 4, 8, 16, 18, 21세대 세포를, 27세 환자는 2, 4, 8, 16, 18 세대 세포를 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, USA)을 이용하여 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 조건에서 배양한 후 세포가 증식함에 따라 실험에 이용하였다.

2. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

60 mm 배양접시에서 배양된 치주인대섬유모세포가 80-90%의 밀생이 될 때까지 5% CO₂, 37°C, 100% 습도의 배양기에서 2일 간격으로 10% FBS가 함유된 DMEM 세포 배양액을 교체하면서 세포를 배양하였다. 80-90%의 밀생이 되었을 때 Trizol Reagent(Invitrogen, USA)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 total RNA를 추출하였다. 배양된 치주인대 섬유모세포의 total RNA 1 µg당 25U의 oligo-d(T) primer와 premix(Bioneer, Korea)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다.

MMP-1, TIMP-1, PDLs22, Type I collagen, Fibronectin, mTR, GAPDH 및 β-actin의 유전자의 염기 서열에 대한 sense와 anti-sense oligonucleotide primer는 주문 제작하였다(Table 1). Reverse transcription(RT) 과정을 통하여 합성한 cDNA를 template로 각각의 20 pmols의 primer, 1 µg의 cDNA, AccuPower Premix(Bioneer, Korea)와 멸균 증류수로 20 µl의 PCR 혼합용액을 만들었다.

Table 1. Primers for RT-PCR.

Primer		Sequences 5' → 3'	Predicted size (base pairs)
β-actin	Sense	CCTCATGAAGATCCTGAACCG	458
	Anti-sense	TCCACACAGAGTACTTGCGC	
MMP-1	Sense	GGT GAT GAA GCA GCC CAG	438
	Anti-sense	CAG TAG AAT GGG AGA GTC	
TIMP-1	Sense	TGC ACC TGT GTC CCA CCC CAC CCA CAG ACG	551
	Anti-sense	GGC TAT CTG GGA CCG CAG GGA CTG CCA GGT	
TIMP-2	Sense	CCG AAT TCT GCA GCT GCT CCC CGG TGC ACC CG	590
	Anti-sense	GGA AGC TTT TAT GGG TCC TCG ATG TCG AG	
PDLs22	Sense	CGGAATTCATGTTACCGAGTACTT	500
	Anti-sense	CAC TTT TTT TAT TTT CACTCTGAC	
COL I	Sense	TTG CTA CTG GTG AGA CTT	470
	Anti-sense	CGC CAC CAA TGT CCA AAG	
FN	Sense	ACC ACG TAG GAG AAC ACT	665
	Anti-sense	ACA GTA TTG CGG GCC AG	
telomerase	Sense	GAGGACAGGAATGGAAGTGG	171
	Anti-sense	CTACCGTCTCACACCGAAGC	

MMP-1: matrix metalloproteinase-1, TIMP-1: tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1, TIMP-2: tissue matrix metalloproteinase inhibitor-2, COL I: Type I collagen, FN: Fibronectin.

PCR은 denaturation, annealing, extension 하는 과정을 35-45회 정도 반복하였고(Table 2), PCR 기계는 PTC-200(MJ Research Inc., Wa-

tertown, MA, U.S.A)이 사용되었다. PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동하여 유전자 발현을 확인하였다.

Table 2. Conditions for RT-PCR.

	Temperature (°C)					Time (min.)
	FN	MMP-1, TIMP-1, TIMP-2	PDLs22	COL I	β-actin, Telomerase	
Predenaturation	94	94	94	94	94	5
denaturation	94	94	94	94	94*	1
Annealing	55	58	45	55	60*	1
Polymerization	72	72	72	72	72	**

** Polymerization time : MMP-1(1.5 min), TIMP-1,2(1.5 min), PDLs22, COL I (1.5 min), FN(2 min), β-actin (1.5 min), Telomerase(1.5 min), *Denaturation and Annealing time : 0.5 min, COL I : Type I Collagen, FN : Fibronectin, min.: minute.

III. 결과

1. 복제노화에 따른 형태학적 변화

일차배양 후 순차적으로 복제노화된 사람치주인대 섬유모세포의 형태학적 변화를 위상차현미경하에서 관찰하였다(Figure 1-3). hPDLF의 복제노화는 19세 환자에서는 21세대, 27세 환자에서는 18세대에서 정지되었다.

노화과정이 진행될수록 세포의 형태는 커지고 납작해졌으며, 3주가 되도록 더 이상의 증식 조건이 관찰되지 않아 정지 상태로 일컬을 수 있는 18세대 혹은 21세대의 세포에서는 배양 시일이 지날수록 증식보다는 세포가 죽어가는 소견을 나타내었다.

2. RT-PCR을 이용한 유전자의 발현 양상

사람치주인대섬유모세포는 노화과정에 따라서

MMP-1, TIMP-1, PDLs22, Type I Collagen, Fibronectin, TIMP-2 및 Telomerase mRNA 유전자가 다양하게 발현되었다(Table 3).

19세와 27세 환자 모두는 노화과정에 따라 Type I Collagen과 Fibronectin mRNA가 약하게 발현되는 경향을 보이다가, Type I Collagen은 마지막 세대에서는 관찰되지 않았으며, Fibronectin은 마지막 세대에서도 미약하게 발현되었다(Figure 4, 5).

MMP-1 mRNA는 18세대 이상에서만 아주 미약하게 발현된 반면(Figure 6), TIMP-1 mRNA는 2세대와 4세대의 젊은 세대에서만 두드러진 발현을 나타내는 상반된 결과를 나타내었다(Figure 4, 5).

PDLs22 mRNA는 19세 환자에서는 2세대, 4세대와 6세대까지, 27세 환자에서는 2, 4세대까지 발현되다가 그 이후에는 발현되지 않았다(Figure 4, 5).

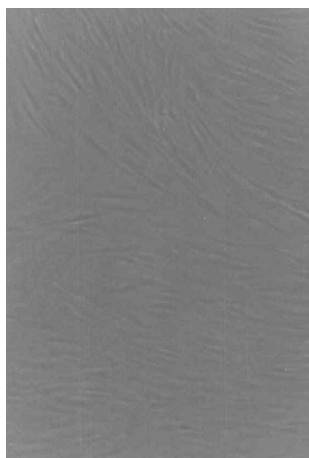


Figure 1. Cultured human periodontal ligament fibroblast(hP-DLF) of passage No. 2 from a 19-year-old donor



Figure 2. Cultured human periodontal ligament fibroblast(hP-DLF) of passage No. 16 from a 27-year-old donor.



Figure 3. Cultured human periodontal ligament fibroblast(hP-DLF) of passage No. 18 from a 19-year-old donor.

Table 3. Summary of differentially displayed cDNAs during aging of human periodontal ligament fibroblast (hPDLF).

	Two		Four		Eight		Sixteen		Eighteen		Twenty-one
	-passage		-passage		-passage		-passage		-passage		passage
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
PDLs22	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TIMP-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
COL I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
FN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
MMP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±
TIMP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Telomerase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-actin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±

+ : positive, - : negative, A : Niteen-years old patient, B : Twenty-seven years old patient, MMP-1: matrix metalloproteinase-1, TIMP-1: tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1, TIMP-2: tissue matrix metalloproteinase inhibitor-2, COL I : Type I Collagen, FN: Fibronectin.

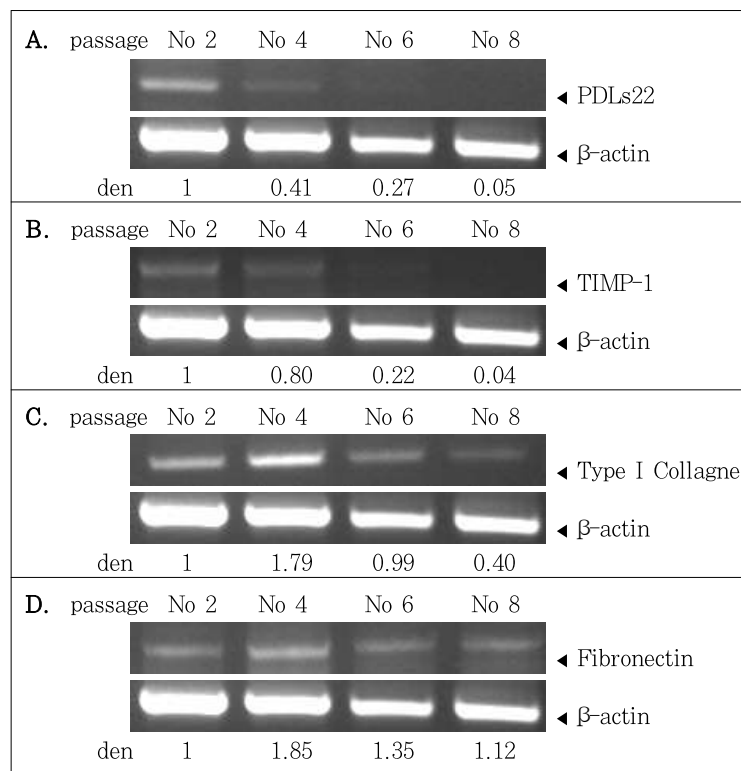


Figure 4. Expression of differentially-expressed genes during aging, detected in hPDLF from an 19-year-old donor by RT-PCR. den, relative amount of mRNA.

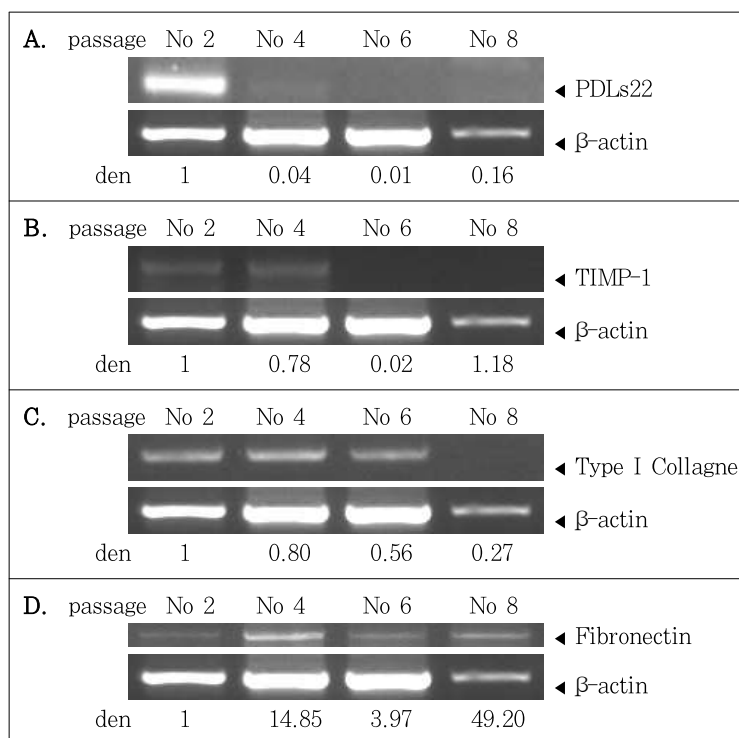


Figure 5. Expression of differentially-expressed genes during aging, detected in hPDLF from an 27-year-old donor by RT-PCR. den, relative amount of mRNA.

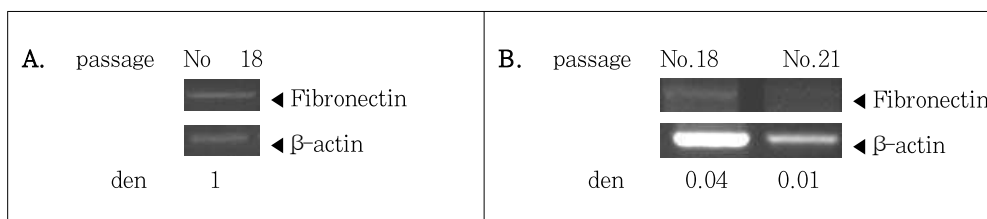


Figure 6. Expression of Fibronectin in passage No 18 and passage No 21 of hPDLF by RT-PCR. A, hPDLF of final passage from a 27-year-old donor; B, hPDLF of No 18 and final passage from a 19-year-old donor. den, relative amount of mRNA.

IV. 및 고안

노화과정(aging)은 사람에서 가령과 더불어 전반적으로 세포의 성장과 분화 등이 생리적으로 감소하는 일련의 반응이라고 할 수 있다¹³⁾. 정상적인 체세포는 실험실에서 계속적으로 계대배양하였을때 계대가 증가할수록 세포증식률은 점차적으로 감소하며,

마지막 세대에서는 증식자체가 멈추게 됨으로서 기능적 변화를 동반하는데, 이러한 실험실적인 일련의 노화과정을 복제노화(replicative senescence)라고 명명하였으나 현재는 사람의 몸에서 일어나는 노화과정을 이러한 복제노화과정으로 간주한다¹⁴⁻¹⁵⁾.

노화의 원인은 여러 가지가 있으나 근본적인 원인으로서는 세포자체의 증식능력이 멈추었기 때문으로

생각되고 있으며, 이러한 증식능력이 소실되면 세포는 죽기 때문에 계속적으로 분열하는 종양에서는 이러한 종양세포를 노화시켜 죽이는 종양억제기전으로 서 노화가 연구되고 있다.

치주질환의 원인은 감염과 교합성 외상뿐만 아니라 치주인대섬유모세포의 노화(aging)를 고려할 수 있는데⁶⁾, 그 이유는 치주인대섬유모세포는 노화가 진행되면서 점차 세포가 죽어가고 치주인대는 섬유화되기 때문인데, 다시말하면 치주질환의 원인에 대한 숙주반응의 저하로 생각할 수 있을 것이다. 현재 까지도 치주치료에 어려움을 겪고 있는 20-30대에 발생가능한 전반적인 공격성 치주염 환자와 중증의 성인형치주염 환자들의 치주인대섬유모세포의 세포 연령은 같은 연령의 정상적인 치주인대를 소유한 환자들보다 세포연령이 더 노화되어 있을 수 있는 가정을 할 수 있다. 그러나 사람치주인대섬유모세포의 노화과정에 따른 연구는 미비한 실정이며 유전자의 발현양상에 관한 연구 또한 미비하다.

만약 치주인대섬유모세포의 노화를 억제하여 섬유조직의 형성보다는 세포증식능력의 향상을 통한 치주인대섬유모세포의 치유 능력이 호전된다면 치주치료의 발전을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 이에 치주인대섬유모세포의 노화여부를 평가할 수 있는 지침이 요구된다고 할 것이다.

세포가 노화될 경우, 세포는 pH 의존성 b-galactosidase activity의 발현, 세포들의 신장된 크기, 유전자의 변화 등이 소개되고 있으나¹⁶⁾, 사람치주인대섬유모세포의 노화연구 및 노화에 따른 유전자의 발현양상에 관한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 사람치주인대섬유모세포의 노화과정에 따른 세포의 형태학적 변화와 유전자의 발현양상을 비교하였는데, 노화과정이 진행될수록 세포의 형태는 커지고 납작해졌다. 본 연구에서는 10대의 경우 21세대에서, 20대의 경우 18세대에서 3주가 되도록 기다려보아도 세포의 증식은 일어나지 않아 마지막 세대로 간주하였으며, 이때의 소견은 세포가 죽어감으로서 세포수가 크게 감소함을 나타내었다. 박 등¹³⁾은 치은섬유아세포의 복제노화(replicative senes-

cence)가 세포주기 진행을 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서 β -actin의 발현 양상이 마지막 세대에서 매우 약하게 나타났는데, 그 이유는 세포가 죽어감으로써 숫자가 감소하고 또한 세포의 기능 이상을 동반하기 때문인 것으로 미루어 생각할 수 있었다. 이상의 결과는 노화과정에 따른 세포주기의 억제와 그 이유를 같이할 수 있을 것으로 사료된다.

노화에 따른 치주인대섬유모세포의 유전자의 발현변화를 분석하는 것은 노화과정이 진행될 수록 세포의 증식이 정지 상태로 진행되는 시간을 연장시킬 수 있는 어떠한 요소를 발견하는데 도움을 줄 것으로 사료된다. 만성적인 창상부위에서 세포외기질의 개조는 TIMP-1이 증가될 경우 MMP-1을 감소시킬 수 있음이 보고되고 있다¹⁷⁾. Hellio 등¹⁸⁾은 미성숙하고 성숙한 토끼의 meniscus의 유전자 발현에 관한 연구를 보고하였는데, 성숙한 부위에서는 MMP-1이 증가한 반면, 미성숙한 부위에서는 Type I collagen이 증가하였음을 보고하였다. Khorra-mizadch 등¹⁹⁾은 진피의 섬유모세포의 노화과정에 따른 collagen과 collagenase의 발현에 관한 실험실적 연구에서, 노화가 진행될 수록 세포증식이 더 느려지고, Type I collagen이 감소한 반면, collagenase의 발현은 증가하였음을 제시하면서, 노인에서의 창상치유 능력이 감소하는 주요 원인으로 설명하였다. 뿐만아니라 세포와 세포, 세포와 기질의 상호작용에 관여하는 Fibronectin은 Type I collagen과 유사하게 노화에 영향을 받음이 여러 연구들에서 보고되고 있다²⁰⁻²²⁾.

이에 본 연구에서는 다른 섬유모세포들에서 노화될 경우 발현의 변화양상을 보였던 유전자들을 대상으로 치주인대섬유모세포의 노화과정에 따른 변화를 비교하였다. 본 연구에서는 MMP-1 mRNA는 복제노화의 마지막 단계에서만 아주 미세하게 발현되는 경향을 나타내었고, TIMP-1 mRNA는 2세대와 4세대의 젊은 세대에서만 발현되었다. 이상의 결과는 다른 결체조직의 섬유모세포들에서의 결과와 유사하였다.

본 연구에서는 10대의 경우 2, 4, 8, 16, 세대에서, 20대의 경우 2, 4, 8세대에서 Type I collagen

의 발현 양상이 감소하는 경향으로 발현되었고, 이 이후의 세대에서는 발현되지 않았다. Fibronectin mRNA는 본 연구의 모든 세대에서 나타났으나, 마지막 세대에서는 아주 미세하게 발현되었다. 이러한 결과들은 본 연구에서 이용한 β -actin의 경우도 10대와 20대 모두 마지막 세대에서는 거의 미약한 발현 양상을 나타낸 것과 연관될 수 있겠으며, 세포가 죽고 기능 이상을 보임을 나타냄을 보여준다고 사료된다.

대부분의 정상적인 세포는 노화가 진행되면 telomere 길이와 구조의 이상을 동반하는데, 이는 telomere에 대해 보상작용을 담당하는 telomerase가 적절하게 활성화되지 못하기 때문인 것으로 노화의 원인으로서 설명되어지고 있다²³⁾. 정상적인 세포들에서는 telomerase가 거의 발현이 되지 않는다고 보고되어왔으나, 치주인대섬유모세포에 대한 연구는 미비하다. 노화가 진행된 세포들의 유전자는 염색조직에서 보이는 유전자의 소견을 보일 수 있다고 보고되고 있기 때문에 주로 중성구에서 발현된다고 알려진 TIMP-2 mRNA의 유무를 분석에 포함하였다²⁴⁻²⁵⁾.

이상과 같이 조직의 분화와 개조에 관련된 것으로 알려진 PDLs22 및 염증과 관련된 것으로 알려진 TIMP-2, 종양세포에서 발현되는 telomerase까지 다양한 유전자의 발현양상을 함께 분석한 이유는 향후 유전자들의 상호 발현관계를 통해 세포의 노화의 정도를 파악하고 나아가 억제할 수 있는 어떠한 요소를 찾는데 도움이 되리라 사료되었기 때문이다.

본 연구에서 PDLs22 mRNA는 복제노화가 진행될수록 그 발현양상이 감소되었는데, 10대와 20대 모두 2세대에서 강한 발현을, 4세대에서 약한 발현을 나타내었고, 10대에서는 6세대에서도 아주 미세하게 발현되었으나 그 이후의 세대에서는 발현되지 않았다. 본 연구 결과 TIMP-2와 telomerase는 발현되지 않았다.

이상의 결과를 통해 PDLs22 mRNA는 치주인대섬유모세포의 특이유전자로서 이미 알려져 있기 때문에 다른 결체조직과 비교하였을때 치주인대를 표시하는 표시자로서, 또한 세포의 증식능력, 즉 노화

의 정도를 파악하는 표시자로서 활용할 수도 있음을 시사한다.

본 연구를 토대로 치주인대섬유모세포의 노화 관련 유전자들의 발현에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각되며, 향후 노화를 억제시켜서 반대로 세포의 치유 능력을 상승시킬 수 있다면 치주치료의 발전을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

V.

치주 조직의 치유를 위해서는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가진 치주인대섬유모세포가 매우 중요하다. 본 연구에서는 RT-PCR 방법을 이용하여 사람치주인대섬유모세포에서 노화과정에 따른 세포학적 형태 변화 및 유전자의 발현 양상을 조사한 결과,

1. 사람치주인대섬유모세포는 노화가 진행될수록 크기가 커지고, 마지막 세대에서는 세포가 죽어가는 소견을 나타내었다.
2. 사람치주인대섬유모세포의 특이 유전자인 PDLs22 mRNA는 2세대, 4세대, 6세대의 젊은 사람치주인대섬유모세포에서 발현되었다.
3. TIMP-1 mRNA는 2세대, 4세대의 젊은 사람치주인대섬유모세포에서 발현되었다.
4. MMP-1 mRNA는 18세대 이상에서 미세하게 발현되는 경향을 나타내었다.
5. Type I collagen mRNA는 거의 모든 세대에서 발현되었으나, 마지막 세대에서는 발현되지 않았다.
6. Fibronectin mRNA는 모든 세대에서 발현되었다. 그러나 마지막 세대에서는 미세한 발현을 나타내었다.
7. β -actin는 마지막 세대에서 그 발현 양상이 미세하게 나타났다.
8. 본 연구에서 TIMP-2, telomerase mRNA는 발현되지 않았다.

이상의 결과, 사람치주인대섬유모세포는 노화가 진행되면서 MMP-1, TIMP-1, PDLs22, Type I collagen, Fibronectin mRNA를 다르게 발현시킴을 관찰할 수 있었다. 향후 건강한 사람뿐만 아니라 치주염 환자들에서 채취한 사람치주인대섬유모세포를 이용한 연구가 필요하리라 사료된다.

VI.

1. Polson AM, Caton J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. *J Periodontol* 1982;53(10):617-625.
2. Kawanami M, Sugaya T, Gama H, et al. Periodontal healing after replantation of intentionally rotated teeth with healthy and denuded root surfaces. *Dental Traumatology* 2001;17(3):127-133.
3. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, et al. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech* 2003;60(5):491-502.
4. Silva TA, Rosa AL, Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues. *Oral Diseases* 2004;10(2):63-74.
5. Ohira T, Myokai F, Shiomi N, et al. Identification of genes differentially regulated in rat alveolar bone wound healing by subtractive hybridization. *J Dent Res* 2004;83(7):546-51.
6. Sawa Y, Phillips A, Hollard J, et al. The in vitro life-span of human periodontal ligament fibroblasts. *Tissue & Cell* 2000;32(2):163-170.
7. Nishimura F, Terranova VP, Braithwaite N, et al. Comparison of in vitro

proliferative capacity of human periodontal ligament cells in juvenile and aged donors. *Oral diseases* 1997;3:162-166.

8. West MD, Pereira-Smith OM, Smith JR. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. *Exp Cell Res* 1989;184(1):138-147.
9. Maruya Y, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Mayanagi H. Expression of extracellular matrix molecules, MMPs and TIMPs in alveolar bone, cementum and periodontal ligaments during rat tooth eruption. *J Electron Microscopy* 2003;52(6):593-604.
10. Martin M, el Nabout R, Lafuma C, Crechet F, Remy J. Fibronectin and collagen gene expression during in vitro ageing of pig skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 1990;191(1):8-13.
11. Chung JH, Seo JY, Choi HR, et al. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2001;117(5):1218-1224.
12. Park JC, Kim HJ, Jang HS, et al. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282(5):1145-1153.
13. 박영채, 양대승, 김재호, 등. Effects of Replicative Senescence on the Cell Cycle Regulation in Human Gingival Fibroblasts. *대한치주과학회지*, 2001;31(1):135-148.

14. Hayflick L. and Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.
15. Kang MK, Bibb C, Baluda MA, Rey O, Park NH. In vitro replication and differentiation of normal human oral keratinocytes. *Exp Cell Res* 2000; 258:288-297.
16. Dimri GP, Lee S, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995;92:9363-9367.
17. Cook H, Davies KJ, Harding KG, Thomas DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 2000;115 (2):225-233.
18. Hellio Le Graverand MP, Reno C, Hart DA. Gene expression in menisci from the knees of skeletally immature and mature female rabbits. *J Orthop Res* 1999;17(5):738-744.
19. Khorramizadeh MR, Tredget EE, Telaskey C, Shen Q, Ghahary A. Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 1999;194 (1-2):99-108.
20. Paz MA, Gallop PM. Collagen synthesized and modified by aging fibroblasts in culture. *In Vitro* 1975;11(5):302-312.
21. Abiko Y, Shimizu N, Yamaguchi M, Suzuki H, Takiguchi H. Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells. *Ann Periodontol* 1998;3(1):350-369.
22. Caputi M, Baralle FE, Melo CA. Analysis of the linkage between fibronectin alternative spliced sites during ageing in rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1995;1263(1):53-59.
23. Rubio MA, Kim SH, Campisi J. Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. *J Biol Chem* 2002;277(32):28609-18617.
24. Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Current biology* 1999;9:939-945.
25. Coletta RD, Almeida OP, Reynolds MA, Sauk JJ. Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- β 1 autocrine stimulation. *J Periodontal Res* 1999;34:457-463.

Cellular study of replicative senescence in human periodontal ligament fibroblast using molecular biology

Byung-Ock Kim^{1,5} · Il-Jun Cho¹ · Joo-Cheol Park^{2,5} ·
Joong-Ki Kook^{3,5} · Heung-Joong Kim^{4,5} · Hyun-Seon Jang^{1,5*}

¹Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chosun University

²Dept. of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University

³Dept. of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

⁴Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, Chosun University

⁵Oral Biology Research Institute, Chosun University

Human periodontal ligament fibroblast(hPDLF) is very important to cure periodontal tissue because it can be diverged into various cells. This study examined the expression of MMP-1, TIMP-1, periodontal ligament specific PDLs22, Type I collagen, Fibronectin, TIMP-2, telomerase mRNA in a replicative senescence of hPDLF.

The periodontal ligament tissue was obtained from periodontally healthy and non-carious human teeth extracted for orthodontic reasons at the Chosun University Hospital of Dentistry with the donors' informed consent. The hPDLF cells were cultured in a medium containing Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, USA) at 37C in humidified air with 5% CO₂. For the reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis, the total RNA of the 2, 4, 8, 16, 18, and 21 passage cells was extracted using a Trizol Reagent(Invitrogen, USA) in replicative hPDL cells. Two passage cells, i.e. young cells, served as the control, and β -actin served as the internal control for RT-PCR

The results of this study about cell morphology and gene expression according to aging of hPDLF using RT-PCR method are as follows:

1. The size of hPDLF was increased with aging and it was showed that the hPDLF was dying in the final passage.
2. PDLs22 mRNA was expressed in young hPDLF of the two, four, and six passage.
3. TIMP-1 mRNA was expressed in young hPDLF of the two and four passage.
4. There was a tendency that MMP-1 mRNA was weakly expressed over eighteen.

5. Type 1 collagen mRNA was expressed in almost all passages, but it was not expressed in the final passage.
6. Fibronectin mRNA was observed in all passages and it was weakly expressed in the final passage.
7. TIMP-2 and telomerase mRNA were not expressed in this study.

Based on above results, it was observed that PDLs22, Type 1 collagen, Fibronectin, MMP-1, and TIMP-1 mRNA in hPDLF were expressed differently with aging. The study using the hPDLF that is collected from healthy patients and periodontitis patients needs in further study.