

배양된 치주인대세포와 치은섬유아세포에서 상이하게 발현된 유전자들의 검토 양상

윤예정¹, 최미혜¹, 여신일¹, 박진우¹, 최병주², 김문규³, 김정철³, 서조영^{1*}

1. 경북대학교 치과대학 치주과학교실,
2. 치과약리학교실
3. 경북대학교 의과대학 면역학교실3

I. 서론

치주조직은 육안적으로 백악질, 치조골이라는 조직과 치은과 치주인대라는 연조직으로 이루어져 있는 복잡하고 고도로 특정화된 기관이다. 두 연조직인 치주인대와 치은을 이루고 있는 주된 세포는 섬유아세포로 조직의 발달, 재생, 정상기능, 병리적 변화 등에서 중요한 역할을 하고 있다¹⁾. 치주인대세포와 치은섬유아세포는 치주조직내 위치의 독특함 때문에 기능에 있어서 차이점을 나타내는데, 치은섬유아세포는 치은연조직의 형성과 유지를 담당하고 치주인대세포는 치주인대의 형성과 유지를 담당할 뿐만 아니라 치조골과 백악질의 치유, 개조, 재생 및 치근면에 새로운 결합조직의 부착에도 기여한다고 알려져 있다^{2,3)}.

전자 현미경상에서 관찰한 치주인대세포와 치은섬유아세포의 형태는 서로 비슷하게 나타나며 섬유아세포 유사형태인 방추형을 나타내었고^{4,5)} 치은섬유아세포는 치주인대세포보다 초기에 밀생상태에 더 빨

리 도달하는데 세포의 크기가 더 크기 때문이며⁶⁾ 세포가 성긴 상태에서는 형태차이를 보이지 않지만 밀생 상태가 되면 치은섬유아세포는 평행하게 한 층으로 자라는 반면, 치주인대세포는 임의로 배열된 세포들이 여러 층을 형성하는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 성장률은 비슷하거나^{4,5)} 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 더 빠르다는 보고⁷⁾가 있는가 하면, 계대 배양에 있어서 세대수가 거듭될수록 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 더 빨리 노쇠하여 증식속도가 감소된다는 보고⁸⁾도 있다.

세포외기질의 합성에 있어서는 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 교원질 제II, III형을 더 활발히 합성하며⁵⁾, Gianopoulou 등⁹⁾은 세포외기질 가운데 교원질 제II, III형은 치은섬유아세포의 부착을 증진시키고 gelatin, laminin, vitronectin은 치주인대세포의 부착을 증진시킨다고 보고하였다. 세포골격단백질의 발현이나 수축성에 대해서는 많이 알려진 바가 없으며 단지 치은섬유아세포에 비해 치주인대세포가 총 actin을 3배정도 많이 함유한다고 알려져 있다^{10,11)}.

본 연구는 한국학술진흥재단 (R04-2003-000-10165-0) 연구비 지원에 의해 수행되었음.

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

E-mail : jysuh@knu.ac.kr

골아세포 유사 특징과 관련된 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성상을 살펴보면 알칼리인산효소의 생성이나 부갑상선 호르몬에 대한 cAMP의 생성은 치주인대세포에서 더 활발하였고¹²⁾, Arceo 등¹³⁾은 치주인대세포가 배양과정에서 광물화된 결절을 형성함을 보고하였다. Nobutcu 등¹⁴⁾과 Kapila 등¹⁵⁾은 세포실험에서 다른 연구들과는 달리 dexamethasone 없이 단지 ascorbic acid와 β -glycerophosphate 만으로 치주인대세포의 광물화가 나타남을 보고하면서 치주인대세포가 골아세포와 유사한 세포를 포함하고 있거나 그 자체가 골아세포 계열이거나 혹은 다기능적인 세포라고 제시하였다. 골관련 단백질의 합성에 있어서는 Ivanovsky 등¹⁶⁾은 치주인대세포에서는 BMP-2가 치은섬유아세포에서는 osteopontin 이 더 많이 발현된다고 보고하였다.

한편, Rose 등¹⁷⁾과 Cho 등¹⁸⁾은 적당한 환경 조건이 주어질 때 치은섬유아세포도 골상을 형성할 수 있다고 제시하였으며 Carnes 등¹⁹⁾은 치은섬유아세포가 알칼리인산효소를 합성하고 1,25-dihydroxyvitamin D3에 반응하여 osteocalcin을 분비하며 광물화된 기질을 형성하는 것을 관찰함으로써 치은조직에서 기원한 세포가 섬유아세포 혹은 골아세포로 분화할 수 있을 것이라고 보고하였다. 또한 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성상에 대하여 여러 개체로부터 배양된 실험군을 설정하였을 때 동일 세포 내에서도 실험군 간의 차이가 있었음을 보고하였다^{19,15,4)}.

이상의 연구결과에서 보듯이 치주인대세포와 치은섬유아세포는 섬유아세포라는 점과 관련하여 유사성을 지님에도 불구하고 생물학, 생화학적 성상에서와 개체 간에서의 성상 발현 정도에서의 차이들을 볼 수 있었다. 이러한 치주인대세포와 치은섬유아세포의 차이점에 관한 연구들이 단편적이었으므로 cDNA microarray를 이용한 동시 유전자 분석을 시행하여 치주인대세포와 치은섬유아세포의 전반적 유전자 발현 양상의 차이점과 개체간의 차이점들을 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포 배양

교정치료를 목적으로 경북대학교병원에 내원한 환자 중 14세 남자 환자 두 명과 18세 여자 환자 한 명에게서 각각 소구치를 발치하고 그 치아의 치은유두의 결합 조직 부위를 채취하여 서 등²⁰⁾의 방법으로 치주인대세포와 치은섬유아세포를 분리, 배양하였다. 배양된 세포가 밀생상태에 이르면 1 : 3으로 계대배양한 후 3~5세대 사이의 세포를 사용하여 100mm 배양접시당 1×10^6 개의 세포를 접종하였다. 단, 동일 환자, 동일 부위에서 얻은 치주인대세포와 치은섬유아세포는 같은 세대의 것을 사용하였다.

2. 총 RNA의 추출

Chomczynski와 Sacchi²¹⁾의 방법을 기본으로 하여 RNA를 다음과 같이 분리하였다. 배양접시에서 배양액을 제거하고 세포층을 찬 PBS 용액으로 씻은 후 TRI REAGENT[®]로 세포를 용해시켰다. 용해물을 끓여모아 미량원침관에 담고 chlorform을 넣고 10초간 강하게 교반하여 얼음에서 15분간 방치한 후 원심분리(12000rpm, 20분, 4°C)하여 상층액을 다른 미량원침관에 옮기고 동량의 isopropanol을 섞어 70% 알코올로 씻고, 상온에서 15분 정도 방치하여 말린 후 물을 각각 50 μ l씩 넣어 녹였다. RNA 양은 UV 분광광도계로 260/280nm에서 흡광도를 잰 후 양과 순도를 계산하였다.

3. cDNA microarray

본 실험에서는 경북대학교 기질세포 유전자 은행에서 모발 간엽세포로부터 제작한 KNU Human 3K 유전자칩을 이용하였다. cDNA microarray는 1.8 cm² 면적의 amino-silane으로 코팅된 slide(CMT-GAPS[™] coated slide) (Corning Inc., 미국)에 전체 3,063개의 cDNA가 배열, 인쇄되어지고 후처리

과정을 거쳐 제작되었다. 이 중 1,290개는 expressed sequences tags(ESTs)와 novel genes이고 1,741개는 named genes이었다. β -actin과 glutaraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 유전자 발현의 보정 목적으로 사용하였다.

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 정량하고 cDNA probe 제작은 DeRisi 등의 방법²²⁾을 변형하여 이용하였다.

mRNA 3 μ g에 oligo-dT(16), Superscript II reverse transcriptase (Gibco사, 미국), fluorescent nucleotide(Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP) (Amersham 사, 미국)등을 가하여 역전사시키고 1.5M sodium hydroxide 1 μ l와 30mM EDTA 1 μ l를 넣어 65°C에서 10분간 처리한 후 468 μ l의 TE buffer(pH 7.4)를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음, Microcon30 (Millipore사, 미국)을 사용해서 정제 및 농축시켰다. 3 \times SSC, 0.5mg/ml poly A blocker (Amersham사)을 함유하는 0.1% SDS, 0.5mg/ml yeast tRNA (Life Technologies사)가 최종 25 μ l로 되어있는 용액에서 Cy3와 Cy5의 형광 probe를 혼합하였다.

5. cDNA microarray hybridization

cDNA microarray를 10mg/ml BSA, 3.5 \times SSC, 0.1% SDS(sodium dodecyl sulfate)용액에 넣어 50°C에서 20분간 prehybridization 시행한 후 증류수와 isopropanol에 담겼다가 원심분리를 이용하여 건조시켰다. 준비된 probe를 95-100°C에서 2분간 가열하여 변성시키고 cDNA microarray slide에 점적하여 cover glass를 덮은 후 CMT-Hybridization chamber (Corning사)에 넣어 50°C의 수조에서 20시간 hybridization하였다. 그리고 나서 cDNA microarray를 상온에서 0.1 \times SSC/0.1% SDS에 5분간

한 번, 0.1 \times SSC에 두 번 수세하고 원심분리를 이용하여 건조시켰다.

6. Scanning과 분석

Hybridization 결과인 형광 세기는 confocal laser scanner인 Scanarray 4000 (GSI Lumonics)을 사용하여 두 가지 형광 상(Cy3와 Cy5)의 경쟁적 결합에 의한 상대적 발현 수치를 측정하고 Quantarray software (GSI Lumonics)를 이용하여 각 이미지를 합성하고 분석하여 치주인대세포와 치은섬유아세포의 유전자별 발현 비율 (Cy3/Cy5비, red와 green의 intensity 비)을 결정하였다. 결과는 각각의 cDNA microarray에 있는 housekeeping gene인 β -actin과 GAPDH를 이용하여 보정하고 Cy3와 Cy5의 발현 비가 2.0 이상인 것, 혹은 0.5 이하인 것을 발현에 유의한 차이가 있는 것으로 결정하였다.

7. Northern blot

총 RNA중 10 μ g을 65°C의 50% formamide, 0.02% formaldehyde, 40mM의 MOPS(3-[N-morpholino]propanesulfonic acid), 10mM sodium acetate, 1mM EDTA용액에서 15분간 데운 후 1% agarose, 55% formaldehyde, 40mM MOPS, 10mM sodium acetate와 1mM EDTA에서 전기영동하였다. 그 후 RNA를 20 \times SSPE에서 Hybond-N⁺ membrane (Amersham사)에 옮기고 나서 RNA를 UV에 노출시켜 cross-linking한 후 공기에서 건조시켰다. probe를 Randomprime labelling system kit (Amersham pharmacia biotech사)를 사용하여 [α -32p]-dCTP (Amersham사)로 label하고 prehybridization과 hybridization을 Express Hyb solution (Clontech사)를 사용하여 시행하였고 hybridization후 membrane을 2 \times SSC/0.1% SDS용액으로 실온에서 씻고 나서 55°C의 0.1 \times SSC/0.1% SDS용액으로 씻고 -70°C에서 intensifying screen으로 Agfa X-ray film에 노출시켰다.

III. 결과

세 명의 환자로부터 치주인대세포와 치은섬유아세포를 배양하여 실험하였으며 실험군 간의 변이가 커서 공통적으로 강하게 발현되는 유전자의 수가 적었다. 전체 3,063개의 유전자들 가운데에서, 61개의 유전자들이 세 번의 실험에서 일관성 있게 특정세포에서 더 강하게 발현되었다. 그 중 12개의 유전자들은 치은섬유아세포에서, 49개의 유전자들은 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었다. 이렇게 특정세포에서 더 강하게 발현된 유전자들을 유전자의 기능에 따라 세포의 신호전달에 관여하는 유전자(Table 1), 세포분열과 DNA 합성에 관여하는 유전자(Table 2), 세포골격 및 유주에 관여하는 유전자(Table 3), 세포방어 및 항상성 유지에 관여하는 유전자(Table 4), 유전자 및 단백질 발현에 관계하는 유전자(Table 5), 대사에 관여하는 유전자(Table 6), 그리고 작용이 알려지지 않은 유전자(Table 7)로 나누었다.

치주인대세포에서 더 강하게 발현된 유전자들 중 intensity 차이가 가장 큰 것은 insulin-like growth factor binding protein(IGFBP)3이었고 치

은섬유아세포에서 더 강하게 발현된 유전자 가운데 intensity 차이가 가장 큰 것은 osteoprotegerin이었다.

세포골격 및 유주에 관여하는 유전자들과 유전자 및 단백질 발현에 관계하는 유전자들 중에는 치주인대세포에서 더 강하게 발현된 유전자들이 많았으며 (Table 3, 5) 그 중 cofilin 1, proteoglycan 1 secretory granule, 교원질 제I형(α 1), α -smooth muscle actin(aorta), adducin γ subunit, 교원질 제III형(α 1), lumican(keratan sulfate proteoglycan), fibronectin은 세포골격 및 유주에 관여하는 유전자들이었고, proteasome subunit α type 7, DEAD/H box polypeptide 1, PAI-1 mRNA-binding protein, tissue inhibitor of metalloproteinase(TIM P)1은 유전자 및 단백질발현에 관계하는 유전자들이었다.

세포방어 및 항상성 유지에 관여하는 유전자인 heat shock 70kda protein 4와 heat shock protein 27은 치은섬유아세포에서 강하게 발현되었고, 대사에 관여하는 유전자인 ATP synthase β 와 phosphoglycerate dehydrogenase는 치주인대세포

Table 1. Differentially expressed genes related with cell signaling and communication

PDL/HGF ratio					
Genebank	Name	exp,1	exp,2	exp,3	Average
HGF specific					
NM_002546	osteoprotegerin	0,39	0,48	0,45	0,44
NM_000597	insulin-like growth factor binding protein 2	0,37	0,41	0,71	0,50
X04526	Homo sapiens hypothetical protein	0,48	0,57	0,49	0,51
NM_003372	VHL binding protein-1(VBP-1)	0,69	0,76	0,51	0,65
PDL specific					
NM_000598	nsulin-like growth factor binding protein 3	5,26	2,94	2,19	3,46
NM_031286	SH3BGRL3-like protein	2,39	1,88	1,62	1,96
NM_004512	interleukin 11 receptor, alpha (IL11RA)	2,15	1,94	1,70	1,93
NM_002775	serine protease with IGF-binding motif	1,56	1,93	1,42	1,63
NM_007263	coatomer protein complex, subunit epsilon	1,65	1,57	1,61	1,61

Table 2. Differentially expressed genes related with cell division

PDL/HGF ratio					
Genebank	Name	exp.1	exp.2	exp.3	Average
HGF specific					
NM_001758	cyclin D1	0,73	0,76	0,74	0,74
PDL specific					
NM_022662	meiotic checkpoint regulator(MCPR)	2,34	4,27	1,95	2,85

Table 3. Differentially expressed genes related with cell structure and motility

PDL/HGF ratio					
Genebank	Name	exp.1	exp.2	exp.3	Average
HGF specific					
NM_001233	caveolin-2	0,24	0,39	0,88	0,50
NM_006329	fibulin 5	0,49	0,38	0,76	0,54
PDL specific					
NM_005507	cofilin 1 (non-muscle) (CFL1)	3,99	1,80	1,32	2,37
NM_002727	proteoglycan 1, secretory granule(PRG1)	3,27	2,06	1,32	2,22
NM_000088	collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)	2,74	2,22	1,30	2,09
NM_001613	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2)	3,02	2,05	1,20	2,09
NM_019903	adducin, gamma subunit	2,23	2,49	1,38	2,03
NM_000090	collagen, type III, alpha 1	3,20	1,65	0,88	1,91
NM_002345	lumican (keratan sulfate proteoglycan)	1,53	2,15	1,66	1,78
NM_002026	fibronectin	1,52	1,52	1,83	1,62
NM_018894	EGF-containing fibulin-like protein	1,74	1,46	1,33	1,51
NM_009933	collagen, type VI, alpha 1	1,23	1,63	1,50	1,45
NM_001615	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	1,46	1,44	1,43	1,44
NM_000138	fibrillin 1	1,18	1,24	1,91	1,44

Table 4. Differentially expressed genes related with Cell and organism defence and homeostasis

PDL/HGF ratio					
Genebank	Name	exp.1	exp.2	exp.3	Average
HGF specific					
AB023420	heat shock 70 kda protein 4	0,36	0,63	0,79	0,59
X54079	heat shock protein27	0,40	1,02	0,44	0,62
PDL specific					

Table 5. Differentially expressed genes related with expression of genes and proteins

PDL/HGF ratio					
Genebank	Name	exp.1	exp.2	exp.3	Average
HGF specific					
NM_003601	SWI/SNF related regulator of chromatin	0,37	0,49	0,85	0,57
NM_005463	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRPDL)	0,75	0,64	0,58	0,66
PDL specific					
NM_002792	proteasome(prosome, macropain) subunit alpha type7	1,94	1,12	3,18	2,08
NM_004939	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His)box polypeptide 1	1,62	3,04	1,53	2,06
NM_015640	PAI-1 mRNA-binding protein (PAI-RBP1	1,27	2,19	1,71	1,72
NM_003254	TIMP1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1)	1,43	1,27	1,60	1,43

Table 6. Differentially expressed genes related with metabolism

		PDL/HGF ratio			
Genebank	Name	exp.1	exp.2	exp.3	Average
HGF specific					
PDL specific					
NM_001686	ATP synthase beta	2,80	2,12	1,77	2,23
NM_005469	peroxisomal acyl-CoA thioesterase	2,68	1,57	1,39	1,88
NM_032692	phosphoglycerate dehydrogenase	2,51	1,10	1,58	1,73
NM_001084	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	2,28	1,32	1,33	1,64

Table 7. Differentially expressed genes related with unclassified genes

		PDL/HGF ratio			
Genebank	Name	exp.1	exp.2	exp.3	Average
HGF specific					
NM_004859	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	0,44	0,66	0,53	0,54
PDL specific					
NM_022543	Rattus norvegicus steroid sensitive gene-1 protein	1,70	2,23	2,00	1,98
NM_004791	osteoblastic specific cytein-rich protein	2,88	1,54	1,23	1,88
NM_016081	palladin (KIAA0992)	1,62	1,93	1,56	1,70
NM_007278	GABA(A) receptor-associated protein	2,13	1,54	1,25	1,64
NM_021034	interferon-induced transmembrane protein 3 (1-8U)	2,01	1,35	1,33	1,56
NM_003311	Tumor suppressing subtransferable cadidate 3	1,56	1,46	1,44	1,49

Table 8. Differentially expressed genes related with unknown/novel genes

PDL/HGF ratio					
Genebank	Name	exp.1	exp.2	exp.3	Average
HGF specific					
PDL specific					
	P0725-5	2,16	2,16	1,66	1,99
L08240	MG81	1,77	2,26	1,92	1,98

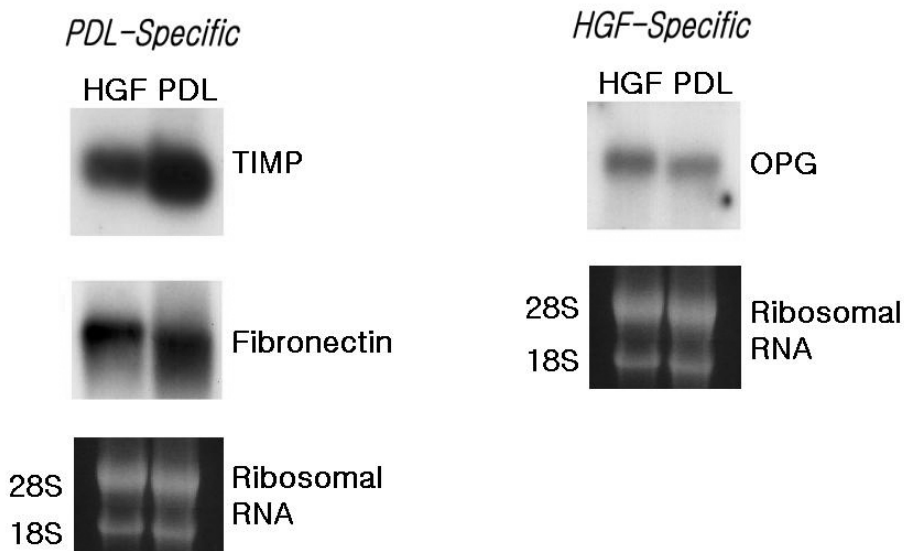


Figure 1. Northern blot analysis of gene expression of PDL cells and HGFs. To verify microarray results on selected genes, we performed northern blot.

PDL : periodontal ligament, HGF : human gingival fibroblast, TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase, OPG : osteoprotegerin

에서 강하게 발현되었다.

세포의 신호전달에 관여하는 유전자 가운데에서 IGFBP2는 치주인대세포에서, IGFBP3는 치은섬유아세포에서 더 강하게 발현되었다.

cDNA microarray의 결과를 바탕으로 특정세포에서 더 강하게 발현된 유전자들 중에서 치은섬유아세포에서 강하게 발현된 유전자인 osteoprotegerin, 치주인대세포에서 강하게 발현된 유전자들인 TIMP1과 fibronectin을 선택하여 northern blot analysis를 시행한 결과는 각각의 유전자들이 우세하게 나타났던 세포에서 더 강하게 발현되었다(Figure 2).

IV. 고안

최근 유전자 발현에 관한 연구에서 많이 이용되고 있는 cDNA microarray는 한번의 hybridization 과정으로 동시에 수천 가지의 유전자 발현 정도를 측정할 수 있다. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 유전자 발현 정도의 차이를 살펴보고자 시행한 본 실험에서는 경북대학교 기질세포 유전자 은행에서 모발 간엽세포로부터 제작한 유전자 칩을 사용하였다.

동일 부위의 치주인대세포와 치은섬유아세포를 세대 배양하여 동일 환자, 동일 세대의 세포에서 mRNA를 추출하여 cDNA microarray와 hybridization하는

과정을 세 명의 환자에게 시행한 결과 세 실험군 간의 변이가 커서 공통적으로 한 세포에서 우세하게 발현되는 유전자의 수는 적었다. 전체 3,063개의 유전자들 중에서, 61개의 유전자들이 세 명의 환자에게 시행한 실험에서 일관성 있게 특정세포에서 더 강하게 발현되었다. 그 중 12개의 유전자들은 치은섬유아세포에서, 49개의 유전자들은 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었다.

치주인대세포에서 강하게 발현된 유전자들이 가장 많았던 것은 세포골격 및 유주에 관한 유전자들이었으며 섬유아세포의 주요 교원질 형태인 교원질 제I형($\alpha 1$), 교원질 제III형($\alpha 1$), 그리고 교원질 제IV형($\alpha 1$), 섬유아세포의 세포외기질인 fibronectin과 lumican(keratan sulfate proteoglycan), 세포의 수축성의 표지인 α -smooth muscle actin(aorta, enteric) 등이 있었다.

Fibronectin은 고분자량(440,000)의 결합조직 내에 존재하는 주요 당단백질이며 주된 세포 부착 부위인 Arg-Gly-Asp(RGD) 배열을 지니고 있는 세포외기질로서 세포와 기질의 접착에 있어서 단백질 부착을 제공하고 세포를 교원질쪽으로 이주하게 하는 것으로 알려져 있다²³. Hou와 Yaeger 등⁵은 같은 배양 조건 하에서 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 교원질 제I형과 fibronectin의 발현이 더 강하게 나타남을 관찰함으로써 치주인대세포의 생합성적 활성도가 더 활발함을 보고하였으며 이들의 결과는 본 실험과 일치하였다. 치주인대세포가 fibronectin의 부분 조각보다는 전체 fibronectin에 부착하며^{5,15}, 치주인대세포내에서 fibronectin과 상호작용하는 αv 와 $\alpha 5$ 가 관찰됨으로 integrin 수용체를 통해서 치주인대세포와 fibronectin이 상호 작용하는 것으로 알려져 있다²⁴.

본 실험에서 lumican은 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었으며, lumican에 관한 연구는 아직 미미하였으나 Cheng 등²⁵은 백악질에서 조직의 광물화와 관계있는 proteoglycan에 관한 연구에서 keratan sulfate proteoglycan으로 lumican과 fibromodulin의 존재를 밝혔고 이들은 precementum

과 pericementocyte와 같은 비광물성 부위에서 넓게 존재함으로 백악질의 광물화 조절에 관여하고 있음을 보고한 바 있다.

Arora와 McCulloch²⁶는 collagen gel contraction을 이용한 연구에서 collagen gel contraction 정도는 α -smooth muscle actin의 발현 정도에 의존적이었음을 관찰함으로써 α -smooth muscle actin이 세포가 세포외기질을 빠르게 개조하고 있다는 기능적 표지가 됨을 보고하였으며, 또한 α -smooth muscle actin은 근섬유아세포를 나타내는 특징중의 하나라고도 알려져 있다^{27,28}. 이러한 α -smooth muscle actin이 본 실험에서는 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었으며 이는 교원질, fibronectin과 같은 세포외기질이 치주인대세포에서 더 강하게 발현된 결과와 함께 미루어볼 때 치주인대세포가 세포외기질의 생성과 개조에 관여하고 있음을 고려해 볼 수 있다.

치주인대세포에서 더 우세하게 발현되었던 유전자들 중에서 교원질 제I형($\alpha 1$), 제IV형($\alpha 1$), fibronectin, lumican, α -smooth muscle actin은 다른 연구²⁸에서는 근섬유아세포의 표지로 이용되었으며, 근섬유아세포는 상처 치유, 세포외기질의 항상성 유지, 조직의 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁹. 육아조직내의 섬유아세포는 형태학적으로, 생물학적으로 섬유아세포와 평활근 세포의 중간 형태의 성질을 나타내며³⁰, 이러한 세포들은 근섬유아세포와 유사한 특징을 지니면서 상처 수축에 필요한 힘을 제공한다고 보고하였다³¹. 본 실험의 결과에서 나타난 바와 같이 치주인대세포가 α -smooth muscle actin을 포함한 세포골격 및 유주에 관한 유전자를 강하게 발현하고 배양과정에서 형태학적, 생물학적으로 몇 가지의 특수 형태로 분화가능하다고 알려져 있으나 치주인대세포가 근섬유아세포 유사 특징을 나타낼 수 있는지에 대한 근거는 아직 미약하다.

치주인대세포에서 강하게 발현되었던 TIMP는 유전자 및 단백질 발현에 관여하는 유전자로서 섬유아세포에서 생성되고 지금까지 네 가지 형태가 보고

32-34)되었으며 TIMP-1과 TIMP-2는 모든 matrix metalloproteinase(MMP)를 억제하며 gelatinase와는 특수한 결합을 보이는 것으로 알려져 있다³²⁾. MMP는 단백질 분해 효소의 한 구성원으로서 결합 조직, 교원질, proteoglycan의 분해, 태아형성기와 성숙한 조직에서의 항상성 유지, 만성 염증에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁵⁾. 이 두 종류의 단백질 사이의 균형이 교원질의 형성과 유지를 조절하는 기전이며³¹⁾ MMP와 TIMP사이의 불균형이 초래되면 결합조직의 파괴가 나타나는 것으로 여겨진다.

Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor(OPG/OCIF)는 tumor necrosis factor(TNF) receptor superfamily의 새로운 구성원으로서 파골 세포의 활성도를 억제함으로써 골 흡수를 억제하는 기능을 가지고 있다^{37,38)}. 폐, 심장, 신장, 태반과 같은 다양한 조직들이 OPG/OCIF transcripts를 가지고 있으며^{37,39)} 세포수준에서는, bone marrow stromal cells, osteoblastic cells, osteosarcoma cell, IMR-90등이 OPG/OCIF mRNA를 발현한다고 알려져 있다^{39,41,42)}. Sakata 등⁴³⁾은 OPG/OCIF가 치은섬유아세포, 치주인대세포, 치수세포등의 치아간엽세포들에서 존재함을 발견하고 이들 세포들이 OPG/OCIF를 분비하여 파골세포와 파치세포의 활성도를 억제함으로써 치조골, 백악질, 상아질과 같은 치아 경조직의 흡수를 조절하는 역할을 한다고 보고하였다. 본 실험에서는 osteoprotegerin이 치은섬유아세포에서 더 강하게 발현되었으며 이러한 결과로 유추할 수 있는 치은섬유아세포의 특성은 적당한 조건이 주어졌을 때 치은섬유아세포가 골상을 형성한다고 보고한 연구^{17,18)}와 섬유아세포 혹은 골아세포로의 분화 가능성을 제시한 보고¹⁹⁾에서 나타나는 치은섬유아세포의 특성과 관련있을 것으로 여겨진다.

cDNA microarray의 결과를 바탕으로 특정세포에서 더 강하게 발현된 유전자들 중에서 치은섬유아세포에서 강하게 발현된 유전자인 osteoprotegerin, 치주인대세포에서 강하게 발현된 유전자들인 TIMP1과 fibronectin을 선택하여 northern blot analysis

를 시행한 결과, 각각의 유전자들이 우세하게 나타났던 세포에서 더 강하게 발현되었으며 이러한 결과를 통해서 cDNA microarray를 이용한 유전자 발현 정도의 측정이 신뢰할 만한 방법으로 여겨졌다.

본 실험에서는 세 명의 다른 환자에게서 치아와 치은유두를 채취하여 치주인대세포와 치은섬유아세포를 배양하고, cDNA microarray를 시행하였다. 세 번의 실험에서 각 유전자들의 발현 정도의 차이가 심하여 세 번 모두 한 세포에서 우세하게 발현된 유전자들의 수가 적었다. 이와 같이 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성상에 관한 실험에서 개체간에 나타나는 차이에 대해 직접적으로 연구 보고한 자료는 거의 없었지만 Somerman 등⁴⁾, Kapila 등¹⁷⁾, 과 Carnes 등¹⁹⁾의 연구들의 자료를 살펴보면 실험 결과에서 여러 실험군간의 차이가 크게 나타남을 통해서 개체간의 차이가 있음을 알 수 있었다. 이러한 개체간의 차이에 대해 몇 가지 사항을 고려해 보면, 먼저 치아와 치은조직을 제공했던 개개의 특성에 의한 영향을 고려해 볼 수 있다. 치주 조직의 건강에 따른 세포의 생활력 정도, 나이에 따른 세포의 분화 정도 등이 영향을 끼칠 수 있을 것으로 여겨지며 무엇보다도 배양된 치주인대세포와 치은섬유아세포들이 불균질한 세포 집단이므로⁴⁴⁾, 환경에 따라 다양하게 분화할 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문에 유전자들의 발현정도가 개체마다 다르게 나타난 것으로 고려해 볼 수 있다.

치주인대세포와 치은섬유아세포는 같은 섬유아세포로서의 유사성을 지니고 있지만 서로 다른 특성을 나타내는 것으로 여겨지며 개체간의 변이가 크게 나타났던 것에 대해서는 앞으로의 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

세 명의 환자로부터 배양한 치주인대세포와 치은섬유아세포로부터 mRNA를 분리하여 제작한 cDNA probe와 3,063개의 유전자를 지닌 cDNA microarray를 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

세 명의 환자에게 시행한 실험에서 일관성 있게 특정 세포에서 더 강하게 발현된 유전자들의 수가 적었으며 전체 3,063개의 유전자 가운데, 61개의 유전자들(12개의 유전자들은 치은섬유아세포, 49개의 유전자들은 치주인대세포)이 일관성 있게 특정세포에서 더 강하게 발현되었다. 세포골격 및 유주에 관한 유전자들은 치주인대세포에서 더 강하게 발현되었고, 주요 교원질 형태인 교원질 제I, III, IV형, fibronectin, lumican, 그리고 α -smooth muscle actin 등이 있었다. MMP와 함께 세포외기질을 조절하는 효소로 알려져 있는 TIMP가 치주인대세포에서 강하게 발현되었고 osteoclastogenesis inhibitory factor인 osteoprotegerin은 치은섬유아세포에서 강하게 발현되었다.

cDNA microarray의 결과를 바탕으로 시행한 northern blot의 결과, 각각의 유전자들이 우세하게 나타났던 세포에서 그 발현이 강하게 나타난 것으로 보아 cDNA microarray를 이용한 유전자 발현정도 측정이 신뢰할 만한 방법으로 여겨진다.

VI. 참고문헌

1. Lekic P and McCulloch CAG. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Res* 1996;245:327-341
2. Boyko GA, Mecher AH, and Brunette DM. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. *J Periodont Res* 1981;16:73-88
3. Gottlow J, Nyman S, Karring T, and Lsindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11:494-503
4. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, and Foster RA. A Comparative Study of Human Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988;67:66-70
5. Hou LT and Yager A. Cloning and Characterization of Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Periodontol* 1993;64:1209-1218
6. Mariotti A and Cochran DL. Characterization of Fibroblasts Derived From Human Periodontal Ligament and Gingiva. *J Periodontol* 1990;61:103-111
7. Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, and Suglya H. Comparison of the Characteristics of Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament cells. *J Periodontol* 1995;66:1025-1031
8. Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, and Sauk JJ. Characteristics of Human Periodontal Ligament Cells in vitro. *Archs Oral Biol* 1990;35:241-247
9. Giannopoulou C and Cimasoni G. Functional Characteristics of Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Dent Res* 1996;75:895-902
10. Beertsen W, Everts V, and Van den Hooff A. Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption. *Archs Oral Biol* 1974;19:1087-1098
11. Pender N, McCulloch CAG. Quantitation of actin polymerisation in two human fibroblast subtypes responding to mechanical stretching. *J Cell Sci* 1991;100:187-193
12. Nojima N, Kobayashi M, Shinonome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodont Res* 1990;25:179-185
13. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA,

- Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol* 1991;62:499-503
14. Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ. Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. *J Periodontol* 1997;68:320-327
15. Kapila YL, Lancero H, Johnson PW. The Response of Periodontal Ligament Cells to Fibronectin. *J Periodontol* 1998;69:1008-1019
16. Ivanovski S, Li H, Haase R, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res* 2001;36:131-141
17. Rose GC, Yamaski A, Mahan CJ. Bone induction in vitro I. Human gingival fibroblast cell lines versus tooth matrix. *J Periodont Res* 1981;16:344-357
18. Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995;66:522-530
19. Carnes DL, Maeder CL, Graves DT. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. *J Periodontol* 1997;68:701-707
20. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승: 치주 인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교, *대한구강생물학회지* 1991;15:14-28
21. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
22. 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* 1996;14:457-460
23. Hynes RO. Fibronectins. *Sci Am* 1986;254:42-51
24. Steffensen B, Duong AH, Milam SB. Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. *J Periodontol* 1992;63:584-592
25. Cheng H, Caterson B, Neame PJ, Lester GE, Yamauchi M. Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum. *Con Tissue Res* 1996;34:87-96
26. Arora PD, McCulloch CAG. Dependence of Collagen Remodelling on α -smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 1994;159:161-175
27. Valentich JD, Popov V, Saada JI, Powell DW. Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am J Physiol* 1997;272:1513-1524
28. Weill FX, Blazejewski S, Blanc JF, Huet S, Gauthier JM, Neaud V, Olaso E, Dubuisson L, Azais-Braesco V, Vidal-Vanaclocha F, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Characterization of a new human liver-myofibroblast cell line : transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 by transforming growth factor beta 1. *Lab Invest* 1997;77: 63-70, 1997
29. Mermelstein CS, Guma FC, Mello TG, Fortuna VA, Guaragna RM, Costa ML, Borojevic R. Induction of the lipocyte phenotype in murine hepatic stellate cells : reorganisation of the actin cytoskeleton. *Cell Tissue Res* 2001;306:75-83
30. Hakkinen L, Larjava H. Characterization of fibroblast clones from periodontal granulation tissue in vitro. *J Dent Res* 1992;71:1901-1907
31. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. α -smooth

- muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990;63:21-29
32. Apte SS, Mattei MG, Olsen BR. Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics* 1984;19:86-90
 33. Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases : A functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 1996;2:70-76
 34. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *J Biol Chem* 1996; 271:30375-30380
 35. Woessner FJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J* 1991;5:2145-2154
 36. Khokha R, Denhardt DT. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases : A review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metastasis* 1989;9:391-405
 37. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin : A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-310
 38. Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176
 39. Yasuda H, Sgima N, Nakagawa N, Mochizuki S, Higashio K. Identity of OCIF and OPG : A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-1337
 40. 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* 1998;247:338-341
 41. Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljungdhal S, Ljunggren O. Tumor necrosis factor- α and - β upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:454-457
 42. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:776-781
 43. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H, Kurihara H. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1486-1492
 44. McCulloch CAG. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec* 1985;258:262

Screening of genes differentially expressed in cultured human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts

Hye-Jeong Yoon¹, Mi Hye Choi¹, Shin-II Yeo¹, Jin-Woo Park¹, Byung-Ju Choi²,
Moon-Kyu Kim³, Jung-Chul Kim³, Jo-Young Suh¹

1. Department of Periodontology
2. Department of Dental Pharmacology, College of Dentistry, 3Department of Immunology, School of Medicine, Kyungpook National University

Periodontal ligament(PDL) cells and human gingival fibroblasts(HGFs) play important roles in development, regeneration, normal function, and pathologic alteration. PDL cells and HGFs have the similarity related with general characteristics of fibroblast such as spindle shaped morphology, the presence of vimentin intermediate filament and the synthesis of interstitial collagens and fibronectin. There were many studies about the differences between PDL cells and HGFs, but they were not about whole gene level. In this study, we tried to explain the differences of gene expression profiles between PDL cells and HGFs, and the differences among three individuals by screening gene expression patterns of PDL cells and HGFs, using cDNA microarray.

Although there were some variants among three experiments, a set of genes were consistently and differentially expressed in one cell type. Among 3,063 genes, 49 genes were more highly expressed in PDL cells and 12 genes were more highly expressed in HGFs.

The genes related with cell structure and motility were expressed more highly in PDL cells. These are cofilin 1, proteoglycan 1 secretory granule, collagen type I(α 1), adducin gamma subunit, collagen type III(α 1), fibronectin, lumican(keratan sulfate proteoglycan), and α -smooth muscle actin. Tissue inhibitor of metalloproteinase known as the enzyme controlling extracellular matrix with matrix metalloproteinase is more highly expressed in PDL cells, osteoprotegerin known as osteoclastogenesis inhibitory factor is more highly expressed in HGFs.

We performed northern blot to verify cDNA microarray results on selected genes such as tissue inhibitor of metalloproteinase, fibronectin, osteoprotegerin. The result of northern blot analysis showed that each cell expressed the genes in similar pattern with cDNA microarray result. This result indicates that cDNA microarray is a reliable method in screening of gene expression profiles.

Key words : cDNA microarray, human gingival fibroblast, periodontal ligament cell

