

치주인대세포의 골기질 단백질 유전자 발현에 대한 Dexamethasone의 영향

정하봉 · 박진우 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주조직의 재생을 위해서는 새로운 백악질과 치조골 그리고, 치주인대의 재생이 필요하므로, 이러한 백악질, 골, 섬유 생성을 담당할 세포의 분화가 필수적이다. 이러한 분화는 치주인대세포가 담당하는 것으로 알려져 있으며, 이 세포는 골아세포성, 백악아세포성, 혹은 기타 섬유아세포성 세포로 분화하는 것으로 보인다.

이중 골아세포로의 분화가 중요하며, 골아세포로 분화시의 특징은 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP 생산 증가^{1, 2)}, 1,25(OH) vitamin D₃에 의한 골 Gla 단백질의 생산 증가^{1, 3, 4)}, 광물화 결절의 생산⁵⁻⁸⁾, 골기질 단백질의 생산^{9, 10)}, 알칼리성 인산효소 (Alkaline phosphatase, ALP)의 생산⁴⁾ 등을 들 수 있다.

이러한 골아세포로의 분화에는 여러 요소가 영향을 미친다. 그중 β -glycerophosphate(β -GP)는 광물화가 이루어지기 위한 인산이온 공급소로 작용하는 것으로 Chung 등¹¹⁾은 보고하였다. 또한, Tenenbaum and Heersche 등^{12, 13)}은 β -GP를 chick periosteal culture에 첨가시 골형성이 유도되고 골아세포 주위에 골결절 침착을 증진시켰다고 보고했

으며, Ecarot-Chamier 등¹⁴⁾도 β -GP가 골아세포의 광물화를 야기시킨다고 보고했다. 또한, Kodama 등¹⁵⁾도 MC3T3-E1 세포를 이용한 실험에서 β -GP가 ALP 활성도를 감소시키고, 단백질 생성물을 감소시키며 matrix vesicle 형성을 증진시킨다고 보고했다. 이러한 β -GP의 기전에 대해 Tenenbaum¹³⁾은 골 형성의 속도를 증가시키고, ALP 활성도를 저하시키며, 골세포로의 thymidine 유도를 감소시킴으로서 가능하다고 보고했다.

시험관적 실험에서 치주인대세포의 골아세포 분화에 Dexamethasone(Dex)이 가장 많은 영향을 미치는 것으로 여겨진다. Dex는 long-acting glucocorticoid 합성물의 일종이며, 다른 glucocorticoid와 마찬가지로 다양한 세포 효과를 조절하며, 다른 호르몬의 세포수용기를 중재^{16, 17)}하며, 골아전구세포의 증식을 자극하고¹⁸⁾, 골수 기질세포를 골아세포로 분화시키는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 이러한 Dex의 작용에 관해 Bellows 등²¹⁾은 Dex가 골아세포로 분화하는 세포수를 증가시키며 glucocorticoid 호르몬이 골 결절수를 증가시킨다고 보고하였으며, Rickard 등²³⁾은 백서 골수기질세포에서 Dex 투여 시 ALP 활성도, osteopontin, bone sialoprotein, osteocalcin mRNA 등

*이 논문은 2000년도 경북대학교의 연구비에 의하여 연구되었음

교신저자 : 서조영, 대구시 중구 동인동 2가 101번지 경북대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 700-422

을 자극하여 골아세포로의 분화를 유도한다고 보고하였고, Nohutcu 등²⁾은 Dex가 골아전구세포의 증식을 자극하고, 골아세포의 분화를 유도하여 부갑상선 호르몬 자극에 의한 cAMP 생산을 조절할 수 있다고 보고했다. 또한, Chen 등²⁴⁾은 Dex가 백서 bone sialoprotein 유전자 자극을 증대한다고 보고하였으며, Mori 등²⁵⁾은 Dex가 혈관 평활근 세포를 골아세포로 분화시켜 혈관내 광물화를 일으킨다고 보고하였다. 그러나, glucocorticoid는 생체 실험에서 과다할 경우 골 형성감소와 골 흡수 증가등을 일으켜 전체골량을 감소시키며,^{19, 20)} 골아전구세포의 성숙 골아세포로의 전환을 감소시켜 골형성을 억제한다^{21, 22)}. Nohutcu 등²⁶⁾은 사람 치주인대세포의 광물화 과정에서 Dex 투여여부와 관계없이 광물화가 이루어지며, Dex가 광물화의 양과 형태를 변화시키는 것은 아니라고 보고하였다.

골기질 단백질은 collagen과 non-collagenous protein으로 나눌 수 있으며, collagen은 대부분 type I collagen(Col I)이다. non-collagenous protein은 Bone Gla protein(BGP), Bone sialoprotein(BSP), osteopontin(OPN), osteonectin(ON), Matrix Gla protein(MGP) 등이 있다. Cho 등²⁷⁾은 Dex를 투여한 백서 치주인대세포에서 단일층을 이루는 초기에 Col I과 SPARC(secreted protein, acidic and rich in cysteine)가 발현되어 이후 감소하며, 세포가 복합적으로 증가한 시기에는 OPN, ALP등이 발현되고, 결절이 형성되는 시기에는 BSP, OC등이 발현된다고 보고하였다. Matsuura 등²⁸⁾은 SPARC는 치주인대, 백악질, 치조골 모두에서 발현되나, BSP는 백악질과 치조골에서만 발현된다고 보고하였으며, Ramakrishnan 등⁹⁾은 BSP와 OPN이 백서 치주인대세포가 생성한 광물화 조직의 대표적 단백질이라고 보고하였다. MGP는 Vitamin K-dependent gamma-carboxyglutamic acid(Gla)의 5, 6 잔기를 가진 단백질로서, 탈회된 소의 골기질에서 추출되었으며 bone Gla protein의 전구세포는 아니라고 Price 등²⁹⁾은 보고하였으며, Ikeda 등³⁰⁾은 백서 골에서 osteocalcin(bone Gla protein), MGP, OPN등을 추출하였으며, 그 mRNA의 발현은 각각 다르게 나타난다고 보고하였다. 이상에서

살펴본 바와 같이 광물화 시에 발현되는 여러 골기질 단백질에 관한 보고 중, 치주인대세포에서 발현되는 MGP에 관한 연구는 아직 없는 것으로 보인다.

이에 본 실험에서는 사람 치주인대세포가 치주재생을 위해 골아세포 내지 백악아세포로 분화하는 기여부와, 이 과정에서 Dex가 광물화에 미치는 영향을 알아보고자 시행하였으며, 광물화 과정에서 발현되는 골기질 단백질 중의 하나인 Matrix Gla protein의 발현 유무를 조사해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료(시약)

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco사, 미국)을 사용하였고, fetal bovine serum (FBS, Gibco사, 미국)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 세포를 계대배양하기 위해 trypsin과 ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA)를, 광물화 유도를 위해서는 ascorbic acid(A.A, Sigma chemical사, 미국), β -glycerophosphate(β -GP, Sigma chemical사, 미국), Dexamethasone(Sigma chemical사, 미국)등을 사용하였다.

2. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 배양

초기배양과정에서 야기될 수 있는 세균감염을 예방하기 위해 500U/ml penicillin (근화제약, 한국)과 500 μ g/ml streptomycin (동아제약, 한국)이 첨가된 DMEM을 생검배지로 준비한 다음 교정치료를 목적으로 경북대학교병원에 내원한 환자의 제1소구치를 발거하여서 등³¹⁾의 방법으로 치주인대세포를 배양하였으며, 본 실험에서는 모든 세포들을 3세대에서 6세대 사이의 세포로 사용하였다.

치주인대 세포 및 치은섬유아 세포를 12 well 배양기에 넣고 배양하여 매 2일 마다 배지를 교환해 주었다. 10% FBS 만을 투여한 군을 대조군으로, 50 μ g/ml A.A와 10mM β -GP투여군을 실험1군, 50 μ g/ml A.A, 10mM β -GP 및 100nM Dex 투여군을 실험2군, 50 μ

/ml A,A, 10mM β -GP 및 5 μ M Dex 투여군을 실험3 군으로 설정하였다.

3. 광물화 결절의 관찰

세포 배양 후, 매 0일, 7일, 14일, 21일 쟈마다 찬 PBS로 2번 씻은 후 실온에서 1시간동안 0.1% Alizarin-Red S 용액에서 배양하였고 세포를 30분 동안 0.1% light green SF solution으로 염색하여 세포를 순차적으로 0.1% acetic acid와 ethanol로 씻은 후 광물화 결절 양상을 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 알칼리인 인산호소(ALP) 활성도 관찰

세포 배양 후, 매 0일, 7일, 14일, 21일 쟈마다 배양액 제거 후 PBS로 2회 씻어내고, 4% Paraformaldehyde로 4°C에서 30분 이상 고정하였다. 이후 증류수로 2회 수세하여 37°C에서 incubation 후 다시 증류수로 수세하여 광학 현미경으로 ALP 활성화 정도를 관찰하였다.

5. MGP의 발현양상 관찰을 위한 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

1) 총 RNA의 추출

RNA를 Chomczynski와 Sacchi³²⁾의 방법에 따라 다음과 같이 분리하였다. 100 mm dish의 세포층을 찬 PBS로 씻은 후 변성용액 (GIT: guanidinium thiocyanate)을 각 dish당 600 μ l씩 넣어 세포를 완전히 녹인 다음, GIT 용액을 2ml의 미량원침관에 옮기고 1/10 용량의 2M sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 동량의 phenol액을 넣었다. GIT용액의 1/5 용량의 chloroform/isoamylalcohol (49:1)을 넣고 10초간 강하게 교반하여 15분 동안 얼음에 방치한 후, 미세 원심분리기로 12000 rpm에서 20분간 원침하여 상층액을 다른 미량원침관에 옮기고 같은 양의 찬 isopropranol로 섞어 -20°C에서 1시간 이상 방치하였다. 그 후 다시 10분 동안 원침하여 침전물을 70% 찬

알콜로 씻고, 상온에서 15분 정도 방치하여 말린 후 물을 각각 50 μ l씩 넣어 녹였다. RNA양은 U.V 분광광도계로 260/280 nm에서 흡광도를 잰 후 양과 순도를 계산하였다.

2) MGP primers 준비

MGP primer의 upstream(5'-ATG AAG AGC CTG ATC CTT CTT-3')과 downstream(5'-TCA TTT GGT CCC TCG GCG CTT-3')을, internal control mark인 GAPDH의 upstream(5'-GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT GGC-3')과 downstream(5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3')을 디자인하여 주문 제작(바오니아사, 한국) 사용하였다.

3) 역전사(cDNA synthesis)

소독된 0.5-ml tube에 RNA/primer mixture를 준비하고 각 sample을 70°C에 10분간 보관한 후 얼음에 최소 1분간 두었다. 10 \times PCR buffer, 25mM MgCl₂, 10mM dNTP mix, 0.1M DTT를 함유한 reaction mixture 7 μ l를 각 RNA/primer mixture에 넣고 잘 혼합시킨 후 짧은 시간동안 원심분리시키고 42°C에 5분간 보관하였다. 그 후 1 μ l SuperScript II RT를 각 tube에 넣어 혼합시킨 후 42°C에 50분간 보관하고 70°C에 15분간 두어 반응을 종료시키고 얼음에 식혔다. 짧은 시간 원심분리기에 넣어 내용물을 모으고 1 μ l의 RNase H를 각 tube에 넣은 다음 37°C에 20분간 보관하였다.

4) PCR amplification

Upstream과 downstream primer 각각 1 μ l씩과 10 \times PCR buffer 5 μ l, 25mM MgCl₂ 3 μ l, 10mM dNTP mix 1 μ l, Taq DNA polymerase (Takara Shuzo사, 일본) 0.5 μ l, cDNA 2 μ l, 소독된 물 36.5 μ l를 넣어 총 부피가 50 μ l되게 한 후 denaturation (94°C, 1분), annealing (55°C, 1분), extension (72°C, 1분)과정을 30회 수행하도록 PTC-100TM(MJ inc., 한국)에 프로그램하여 시행하였다. PCR 생성물 10 μ l를 1.5 μ l의 loading buffer와 섞은 후 1% agarose gel에 100V로 40분간 전기영동하여 비교하였다.

III. 성적

1. 시간 경과에 따른 세포형태의 변화 양상

시간이 경과함에 따라 초기에 일정한 방향성을 가지는 단일층의 밀생 시기를 보였고, 7일경에는 세포 크기와 수가 증가하여 복합적 형태를 나타냈다. 그리고, 14일 이후에는 세포들의 방향성이 없어지고 치밀해 졌으며, 21일 경에는 더욱 치밀해진 양상을 관찰할 수 있었다(Figure 1).

2. 광물화 결절의 형성

광물화 결절 생성 유무를 관찰하기 위해서 Alizarin-Red S 염색을 시행한 결과, Dex를 투여한 배양 21일의 실험 2, 3군에서 치밀해진 세포군 주위가 붉게 염색되는 것으로 미루어 보아 광물화 결절이 생성되었음을 관찰할 수 있었다(Figure 2). 또한, Dex 100nM을 투여한 실험 2군보다는 5 μ M을 투여한 실험 3군에서 전 세포군에 염색 정도가 더 진하

고, 넓게 퍼져있는 것으로 보아, 광물화 형성 정도는 농도의존적으로 발생하였음을 알 수 있었다. 한편, 치은섬유아세포에서는 배양 21일 경에도 대조군과 실험군 모두에서 Alizarin-Red S 염색 시 붉은 색을 띠는 세포군이 관찰되지 않으므로, 광물화 결절은 형성되지 않은 것으로 여겨진다(Figure 3).

3. Alkaline phosphatase 활성도 관찰

ALP 활성도를 비교해보면 치주인대세포에서 0, 7일 경에는 활성도를 보이지 않았으며, 14일경에 높은 활성도를 나타냈으며, 21일에도 14일과 유사한 활성도를 유지하였다(Figure 4).

4. MGP 유전자 발현 양상

대조군과 실험군 모두에서 Matrix Gla Protein에 대한 유전자의 발현이 나타났으며, 그 발현양상은 두 군 모두에서 시간에 따라 일정하게 나타났다(Figure 5).

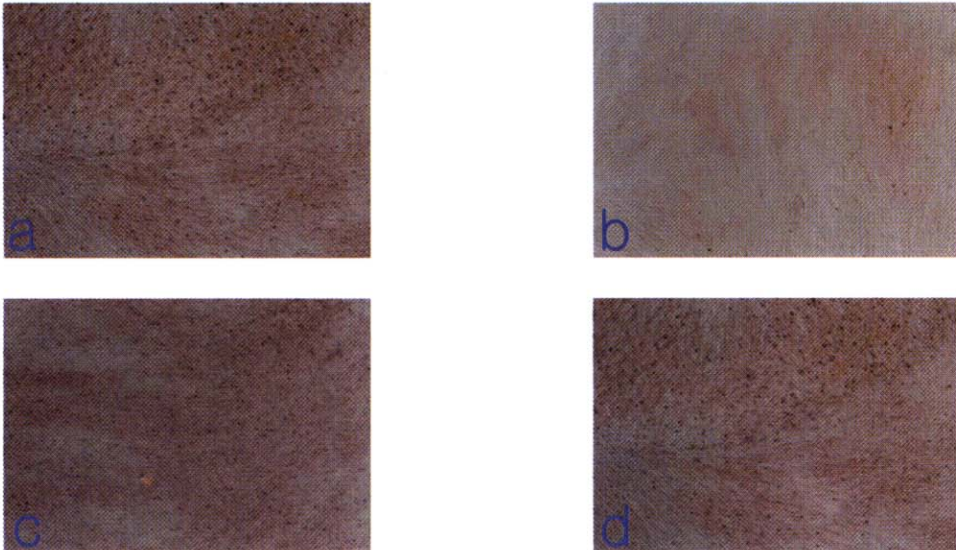


Figure 1. PDL Control group cells were cultured according to time and stained in situ with Alizarin-Red S for calcium determination($\times 100$) (a:0day b:7day c:14day d:21day)

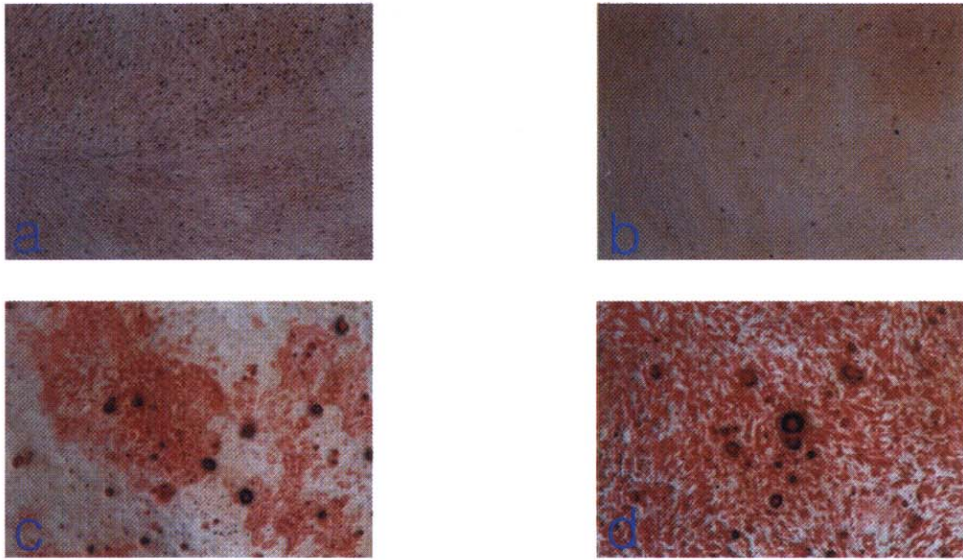


Figure 2. Periodontal cells were cultured for 21days and stained in situ with Alizarin-Red S for calcium determination($\times 100$).

- a: Control
- b: Exp. 1 group(A,A and β -GP added group)
- c: Exp. 2 group(A,A, β -GP and 100nM Dex added group)
- d: Exp. 3 group(A,A, β -GP and 5 μ M Dex added group)

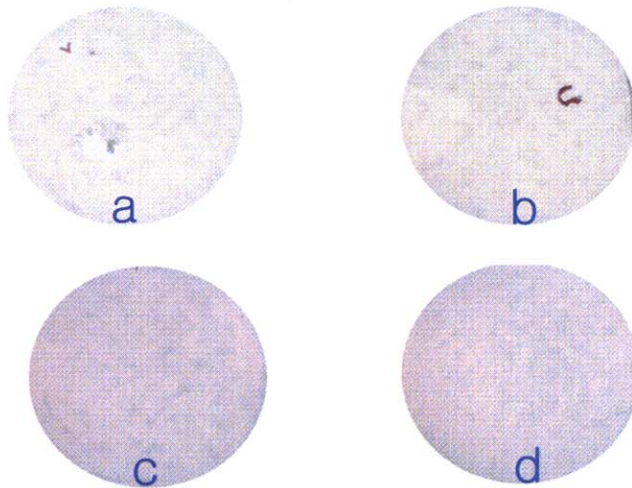


Figure 3. Human gingival fibroblast were cultured for 21days and stained in situ with Alizarin-Red S for calcium determination($\times 100$).

- a: Control
- b: Exp. 1 group(A,A and β -GP added group)
- c: Exp. 2 group(A,A, β -GP and 100nM Dex added group)
- d: Exp. 3 group(A,A, β -GP and 5 μ M Dex added group)

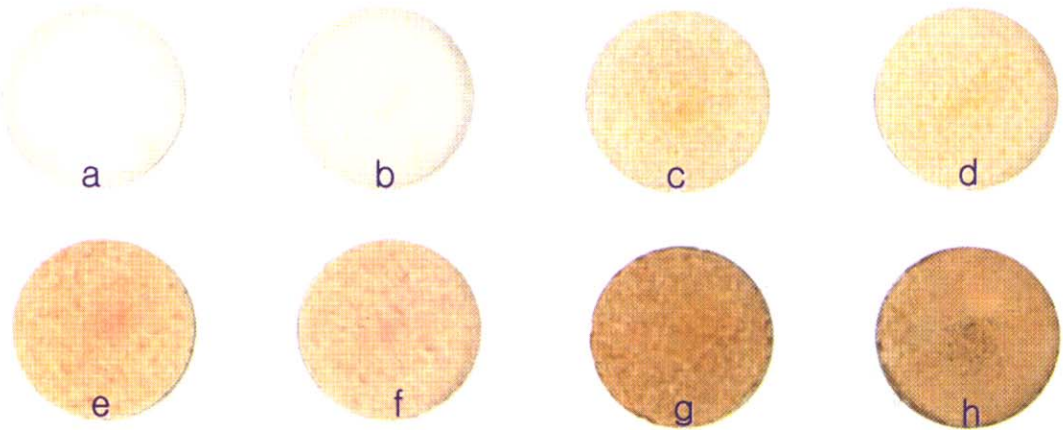


Figure 4. PDL cells were cultured according to time and stained in situ for ALP activity($\times 100$).
 a:Exp 2, 0day, b:Exp 3, 0day, c:Exp 2, 7day d:Exp 3, 7day
 e:Exp 2, 14day f:Exp 3, 14day, g:Exp 2, 21day h:Exp 3, 21day

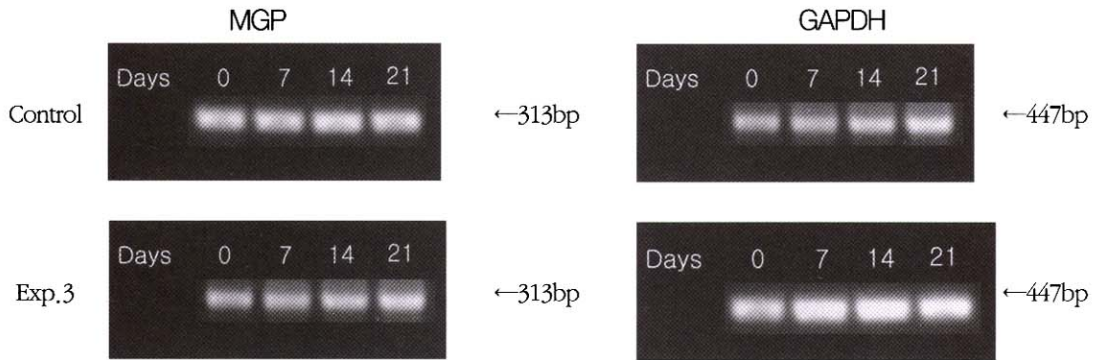


Figure 5. Expression of Matrix Gla Protein(MGP) in the PDL cells with or without Dexamethasone(Dex)
 MGP expression of Control group was similar with Exp. 3 group(A,A, β -GP and 5 μ M Dex treated group).
 Expression of MGP was constant at 0, 7, 14, 21 day. GAPDH was used for internal control marker.

IV. 고찰

치주조직 파괴에 대한 통상적인 치주치료 후 생길 수 있는 치유 양상은 회복, 재부착, 신부착, 재생 등으로 이루어진다. 이들 중 파괴된 치주조직에 신생골, 신생백악질과 함께 새로운 치주인대섬유가 기능적으로 삽입, 배열되어 재형성되는 재생이 가장 이상적인 치유형태로 알려져 있다. 치주조직을 구성하고 있는 치은상피세포, 치은결합세포, 치조골세포 및 치

주인대세포들이 치주치료 후 치유부에 이주해 올 수 있으며, 이들 세포들 중 치주인대에서 유래된 세포만이 치주조직재생에 기여한다고 알려져 있다. 치근면으로 이주하는 세포들 중 치은섬유아세포는 치은결합조직내에 존재하는 세포의 약 65-85%를 차지하며 방추형 또는 성상형의 형태로 교원질과 탄력소 등의 여러 가지 섬유와 결합조직의 기질을 생성하고 유지하여 치주조직의 치유에 관여하고 있다. 그리고, 치주인대는 섬유아세포, 조골세포, 백악질세포, 파골세포, 미분화 증배엽세포들을 모두 포함하고 있으며 치

주조직의 신부착 및 재생에 결정적으로 관여한다.

본 실험에서 치주인대세포를 분리 배양한 결과, 시기에 따라 세포형태의 특징적 양상이 나타남을 알 수 있었다. 즉, 시간이 경과함에 따라 초기에 일정한 방향성을 가지는 단일층의 밀생 시기를 보였고, 7일 경에는 세포 크기와 수가 증가하여 복합적 형태를 나타냈으며, 14일 이후에는 세포들의 방향성이 없어지고 치밀해 졌으며, 21일 경에는 더욱 치밀해진 양상을 관찰할 수 있었다. 이는 Cho등⁵⁾이 백서 치주인대세포에서 시기에 따라 분류한 것과 유사한 양상을 보인 것으로 사료된다.

치주조직 재생을 일으킬 수 있는 치주인대세포의 골아세포로의 분화에는 여러 물질이 관여하나, 그 중 대표적인 것으로 Dexamethasone이 있다. Dex에 의한 세포분화에 관해 Bellows등²¹⁾은 백서 두개골의 골아전구세포에서 Dex 투여 시 골결절의 크기와 수가 증가함을 보고했으며, Kasugai등¹⁸⁾도 Dex 투여 시 백서 골수세포가 골아세포 형태로 분화함을 보고했고, Cheng등³³⁾도 사람 골수기질세포가 골아세포로 분화됨을 보고하였다.

이에 본 실험에서는 치주인대세포의 골아세포로의 분화를 관찰하고, Dex가 광물화에 미치는 영향등을 알아보고자 시행하였다. 실험결과, Dex 투여군에서 21일째에 골 결절이 형성되었으며, 이때 ascorbic acid와 β -GP만을 투여한 군에서는 골 결절이 형성되지 않았다. 이는 Dex 투여한 경우에만 결절이 생성되었다는 Cho등⁵⁾의 보고와 일치하며, Nohutcu등²⁶⁾이 치주인대세포에서 Dex 투여와 상관없이 배양 20일경에 ascorbic acid와 β -GP만 투여한 군에서도 결절이 생성되었다는 보고와 Mukai등⁷⁾이 치주인대세포를 28일간 배양하여 β -GP 첨가 시 2일 후 광물화 결절이 생성되었다는 보고와는 상반된다. 이와 같은 상반된 결과가 야기된 원인은 본 실험에서 21일 까지만 배양하여 관찰한 점 즉, 시기적 문제와 더불어, 치주인대세포 공여자의 나이, 세대 등에서 오는 차이가 있었으리라 사료된다.

본 실험에서는 Dex 농도를 100nM과 5 μ M로 구분하여 실험군을 설정하였다. 이는 Cho등⁵⁾이 5 μ M을 투여하여 결절 형성을 보고한 것과 Somerman등²⁶⁾

이 100nM을 투여한 것을 고려하여, 두 농도차를 비교하고자 시행하였다. 실험결과 100nM에서도 광물화 결절이 생성되었으며, 5 μ M에서는 더 많은 결절이 생성되었다. 즉, 농도의존적으로 광물화 결절 형성이 증가하였다. 이는 치주인대세포에 Dex 투여 시 부갑상선 호르몬 자극에 의한 cAMP 생산이 농도의존적으로 증가함을 관찰한 Nohutcu등²⁶⁾의 보고와 맥락이 닿는 것으로 사료된다. 그리고, 100nM에서도 광물화 결절이 생성되는 바, 앞으로 여러 인자나 요소에 의한 비교연구 시에는 5 μ M 정도의 높은 농도보다는 100nM 정도의 농도를 사용하는 것이 적절하리라 사료된다.

치주인대세포와 치은섬유아세포의 성상을 비교하고찰을 살펴보면, Somerman등⁴⁾은 치은섬유아세포의 단백질, collagen 생산 및 ALP 활성도가 낮다고 보고하였으며, Nojima등³⁾은 치은섬유아세포의 cAMP 생산이 낮다고 보고하였다. 또한, Arceo등¹⁾도 치주인대세포에 비해 치은섬유아세포는 골 결절을 형성하지 않는다고 보고하였다. 본 실험에서도 치은섬유아세포에 의해 골 형성이 야기되지는 않았다. 즉, 치은섬유아세포는 골아세포로의 분화능이 없는 것으로 보이며, 치주인대 세포가 골아세포로의 분화능을 가진 것으로 사료된다.

ALP는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로서, 석회화과정에 관여하는 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않지만, Krzysztof등³⁴⁾은 골아세포의 주요한 지표로서 비교적 높은 pH인 8-10 정도에서 monoester phosphate를 가수분해해서 주로 골이 형성될 때 높은 농도로 발현된다고 보고하였으며, Stein등³⁵⁾은 높은 ALP 활성은 골세포 분화의 표지인자라고 보고하였다. 이러한 점을 고려해 볼 때, ALP 활성도는 치주인대세포의 골아세포 분화 시의 한 가지 검증 지표로서 의의가 있다고 하겠다. 치주인대세포에서의 ALP 활성도에 관하여, 서등³¹⁾, Nojima등³⁾, Mukai등⁷⁾은 치주인대세포에서 강한 ALP 활성도를 보였다고 보고하였으며, Cho등⁵⁾은 치주인대세포의 세포막에서 특히 강한 활성도를 보인다고 보고하였다. 본 실험에서는 Dex를 투여한 실험 2, 3군의 0, 7일에서는 거의 활성도를 보이지 않았으나, 14일과 21일에는

강한 활성도를 보였다. 이는 세포배양 후 복합층을 형성하는 시기에서 ALP가 발현되기 시작하여 이후 높은 수준을 유지한다고 보고한 Chien등²⁷⁾의 보고와 일치하는 것으로 사료된다.

골조직에는 여러 단백질 성분이 존재하며, 광물화 결절 생성 시 여러 골기질 단백질이 발현된다. Chen 등³⁶⁾은 BSP가 상아질 및 골 기질의 주 단백질이며, 연골세포, 섬유아세포, 근육세포 등에서는 발현되지 않는다고 보고 하였고, Bianco등³⁷⁾은 BSP가 주로 골 아세포의 분화말기에 관찰된다고 보고하였다. Malaval등³⁸⁾은 골결절이 형성되는 동안 OCN, BSP, ALP의 발현은 증가하였으나, OPN은 감소하고, SPARC/ON등은 변화가 거의 없었다고 보고하였다. Matrix Gla protein(MGP)는 여러 조직에 존재하는 Vitamin K-dependent 세포의 기질 단백질로 생체대사 및 발육시의 특정시기 및 특정조직에서 증가된 양상을 보인다.^{39, 40)} MGP는 아직 그 기능이 명확히 밝혀지지 않는으나, Luo등⁴¹⁾은 동맥이나 연골에서의 골화 과정 시 억제요소로 작용한다고 보고하였으며, Yagami등⁴²⁾은 실험적으로 과다하게 발현시킨 경우 연골의 광물화를 방해하며, 연골아세포의 성숙을 지연시키며, 연골성 골화와 막내골화의 형성은 억제한다고 보고하였다. 또한, Lawton등⁴³⁾은 정상치유조직에 비해 비접합된 골절부에서 발현되는 것으로 보아 광물화 시 억제작용을 하는 것으로 보인다고 보고하였다. 이상의 보고에서처럼 MGP는 골 생성의 억제요소로 작용하는 것으로 사료되므로, 치조골과 치아라는 두 경조직에서 지속적으로 연조직 형태를 유지하고 있는 치주인대에서의 광물화 과정 시 변화 과정을 밝혀보고자 본 실험을 시행하였다. 실험결과, 치주인대세포의 대조군과 실험군 모두에서 MGP의 발현이 감지되었으나, 그 발현양상은 일정하였음을 고려해 볼 때, MGP는 치주인대세포의 광물화에는 관여하지 않는 것으로 사료된다. 그러나, 그 정확한 작용에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라 본다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 치주인대세포는 Dex 투여에 의해 광물화 결절을 생성할 수 있는 골아세포로 분화할 능력을 보유하고 있으며, 또한 Dex에

의해 농도의존적으로 결절 형성을 증가시키는 것으로 사료되나, 이 결절 성분이 백악질 성분인지 혹은 골 결절 성분인지는 좀 더 확인 연구되어야 할 것으로 보인다. 본 실험의 결과는 치주인대 세포의 분화에 영향을 미치는 여러 성장인자나 기타 요소 투여에 의한 치주조직 재생 실험의 기준이 될 수 있으며, 치주인대세포의 분화에 관여하는 유전자 발현 연구에도 도움이 되리라 사료된다.

V. 요약

치주조직 재생을 위해서는 새로운 백악질과 치조골 그리고, 치주인대의 재생이 필요하며, 이러한 재생을 담당할 세포의 분화가 필수적이다. 이러한 분화를 담당하는 것은 치주인대세포이며, 이 중 골아세포의 분화가 중요하다.

본 실험의 목적은 치주조직 재생에 있어서 중요한 요소인 치주인대세포의 골아세포성 세포로의 분화를 관찰하며, Dex가 광물화에 미치는 영향과 농도에 따른 차이를 알아보고자 시행하였다. 또한, 광물화 시 발현되는 여러 골기질 단백질 중 Matrix Gla Protein의 발현양상도 관찰하였다.

교정치료를 목적으로 내원한 환자의 제1소구치 부위의 정상치은을 절제하고, 건강한 제1소구치를 발거하여 치은섬유아세포와 치주인대세포를 분리, 배양하여, ascorbic acid와 β -glycerophosphate 투여군을 실험1군, ascorbic acid, β -glycerophosphate, Dex 100nM 투여군을 실험2군, ascorbic acid, β -glycerophosphate, Dex 5 μ M 투여군을 실험3군, 그리고, 단순 배양만 시킨군을 대조군으로 하여 비교하였다.

시간경과에 따른 치주인대세포 형태의 변화 양상은 초기에 방추형 혹은 다각형의 단일층 형태에서 7일경에는 세포 크기와 수가 증가하여 복합층 형태로 변화했으며, 배양 14일 이후에는 세포들의 방향성이 없어지고, 더욱 치밀해 졌다. 골 결절형성은 치주인대세포의 Dex 투여군에서만 21일째에 나타났으며, 5 μ M 투여군에서 100nM 투여군보다 더 많이 나타났다. ALP 활성도를 비교해보면 치주인대세포에서 0, 7일 경에는 활성도를 보이지 않았으며, 14일경에 높

은 활성도를 나타냈으며, 21일에도 비슷한 활성도를 유지하였다. MGP 유전자 발현 양상은 대조군과 실험군 모두에서 Matrix Gla Protein에 대한 유전자의 발현이 나타났으며, 그 발현양상은 모든 시기에서 일정하였다.

이상의 결과로 보아 치주인대세포는 골아세포로의 분화가 가능하며, Dex는 농도의존적으로 광물화에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그리고, MGP는 치주인대세포에서 발현이 감지되었으며, 광물화에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

- Arceo, N., Sauk, J. J., Moehring, J., Foster, R. A., and Somerman, M. J. : Human Periodontal Cells Initiate Mineral-Like Nodules In Vitro, *J. Periodontol.*, 62: 499-503, 1991
- Nohutcu R. M., Somerman M. J., and McCauley L. K. : Dexamethasone enhances the effects of parathyroid hormone on human periodontal ligament cells in vitro, *Calcif. Tissue Int.*, 56: 571-577, 1995
- Nojima, N., Kobayashi, M., Shinome, M., Takahashi, N., Suda, T. and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells derived from the bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts, *J. Periodont. Res.*, 25: 179-185, 1990
- Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm, G. R., and Foster R. A. : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, *J. Dent. Res.*, 67: 66-70, 1988
- Cho, M. I., Matsuda, N., Lin, W. L., Moshier, A., and Ramakrishnan, P. R. : In Vitro Formation of Mineralized Nodules by Periodontal Ligament Cells from the Rat, *Calcif. Tissue Int.*, 50: 459-467, 1992
- Pitarus, S., McCulloch, C. A. G., and Narayanan, S. A. : Cellular origins and differentiation control mechanism during periodontal ligament development and wound healing, *J. periodont. Res.*, 29: 81-94, 1994
- Mukai, M., Yoshimine, Y., Akamine, A., and Maeda, K. : Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells, *Cell. Tissue Res.*, 271: 453-460, 1993
- Bhargava, U., Bar-Lev, M., Bellows, C. G. and Aubin, J. E. : Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria, *Bone*, 9: 155-163, 1988
- Ramakrishnan, P. R., Lin, W. -L., Sodek, J., and Cho, M. I. : Synthesis of non-collagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro, *Calcif. Tissue Int.*, 57: 52-59, 1995
- Nohutcu, R. M., McCauley, L. K., Shigeyama, Y., and Somerman, M. J. : Expression of mineral-associated proteins by periodontal ligament cells: in vitro vs. ex vivo, *J. Periodont. Res.*, 31: 369-372, 1996
- Chung, C. H., Golub, E. E., Forbes, E., Tokuko, T., and Shapiro, I. M. : Mechanism of Action of β GP on Bone Cell Mineralization, *Calcif. Tissue Int.*, 51: 305-311, 1992
- Tenenbaum, H. C. : Role of organic phosphate in mineralization of bone in vitro, *J. dent. Res.*, 60: 1586-1589, 1981
- Tenenbaum, H. C., and Heersche, J. N. M. : Levamisole and inorganic pyrophosphate inhibit β glycerophosphate-induced mineralization of bone formed in vitro, *Bone Miner.*, 3: 13-26, 1987
- Ecarot-Charrier, B., and Glorieux, F. H., Van Der Rest, M., Pereira, G. : Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J. Cell. Biol.*, 96: 639-643, 1983
- Kodama, H. A., Amagai, Y., Sudo, H., Ohno, T., and Iijima, K. I. : Culture conditions affecting differentiation and calcification in the MC3T3-E1

- osteogenic cell line, In: Ali SY (ed) Cell-Mediated calcification and matrix vesicles. Elsevier Science Publishers B. V., pp 297-302, 1986
16. Salhanick, A. I., Krupp, M. N., and Amatruda, J. M. : Dexamethasone stimulate insulin receptor synthesis in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 258: 14130-14135, 1983
 17. Invanovic, V., and Weinstein, I. B., Glucocorticoids and benzopyrene have opposing effects on EGF receptor binding. *Nature*, 293: 404-406, 1981
 18. Kasugai, S., Todescan, R., Nagata, T., Yao, K-L., Butler, W. T., and Sodek : Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro : Inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype, *J. Cell. Physiol.*, 147: 111-120, 1991
 19. Baylink, D. J. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 309: 306-308, 1983
 20. Burckhardt, P. Corticosteroid and bone : A review. *Hormone Res.*, 20: 59-64, 1984
 21. Bellows, C. G., Heersche, J. N. M., and Aubin, J. E. : Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev. Biol.*, 140: 132-138, 1990
 22. Dietrich, J. W., Canalis, E., Maina, D. M., and Raisz, L. G. : Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology*, 104: 715-721, 1979
 23. Rickard, D. J., Sullivan, T. A., Shenker, T. A., Leboy, P. S., and Kazhdan, I. : Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev. Biol.*, 161: 218-228, 1994
 24. Chen, J., Sodek, J., Thomas, H. F., and Ranly, D. M. : Dexamethasone Stimulates Luciferase gene expression through the rat bone sialoprotein gene promoter in transgenic mice. *Connect. Tissue Res.*, 4: 33-9, 1996
 25. Mori, K., Shioi, A., Jono, S., Nishizawa, Y., and Morii, H. : Dexamethasone enhances in vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 2112-2118, 1999
 26. Nohutcu, R. M., McCauley, L. K., Koh, A. J., and Somerman, M. J. : Expression of Extracellular Matrix Proteins in Human Periodontal Ligament Cells During Mineralization In Vitro. *J. Periodontol.*, 68: 320-327, 1997
 27. Chien, H. H., Lin, L. W., and Cho, M. I. : Expression of TGF- β isoforms and their receptors during mineralized nodule formation by rat periodontal ligament cells *in vitro*. *J. Periodont. Res.*, 34: 301-309, 1999
 28. Matsuura, M., Herr, Y., Han, K. Y., Lin, W. L., Genco, R. J., and Cho, M. I. : Immunohistochemical Expression of Extracellular Matrix Components of Normal and Healing Periodontal Tissues in the Beagle Dog. *J. Periodontol.*, 66: 579-593, 1995
 29. Price, P. A., Urist, M. R., Otawara, Y. : Matrix Gla Protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun.*, 117: 765-771, 1983
 30. Ikeda, T., Nomura, S., Yamaguchi, A., Suda, T., Yoshiki, S. : In situ hybridization of bone matrix proteins in uncalcified adult rat bone sections. *J Histochem Cytochem*, 40: 1079-1088, 1992
 31. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교, *대한구강생물학회지*, 15 : 14-27, 1991
 32. Chomczynski, P., and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.*

- Biochem., 162: 156-159, 1990
33. Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F., and Avoli, L. V. : Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro. : Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 134: 277-286, 1994
 34. Krzysztof, H. W., Reddi, A. M. : Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif. Tissue. Int.*, 39 : 382-385, 1986
 35. Stein, G. S., Lian, J. B., and Owen, T. A. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB. J.*, 4 : 82-94, 1990
 36. Chen, J. K., Shapiro, H. S., Wrana, J. L., Reimers, S., Heersche, J. N., and Sodek, J. : Localization of Bone Sialoprotein(BSP) Expression to Sites of Mineralized Tissue Formation in Fetal Rat Tissues by *In Situ* Hybridization. *Matrix*, 11: 133-143, 1991
 37. Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., and Robey, P. G. : Expression of Bone Sialoprotein(BSP) in Developing Human Tissues. *Calcif. Tissue Int.*, 49 : 421-426, 1991
 38. Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A. K., and Aubin, J. E. : Cellular Expression of Bone-Related Proteins During In Vitro Osteogenesis in Rat Bone Marrow Stromal Cell Cultures. *J. Cell. Physiol.*, 158: 555-572, 1994
 39. Zaro, J., and Nishimoto, S.k. : Matrix Gla protein gene expression is elevated during postnatal development. *Matrix Biol.*, 15:2 131-40, 1996
 40. Barone, L. M., Owen, T. A., Tassinari, M. S., Bortell, R., Stein, G. S., and Lian, J. B. : Developmental expression and hormonal regulation of the rat matrix Gla protein(MGP) gene in chondrogenesis and osteogenesis. *J. Cell. Biochem.*, 46:4 351-65, 1991
 41. Luo, G., Ducey, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., and Karsenty, G. : Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386:6620 78-81, 1997
 42. Yagami, K., Suh, J.Y., Enomoto-Iwamoto, M., Koyama, E., Abrams, W. R., Shapiro, I. M., Pacifici, M., and Iwaoto, M. : Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J. Cell. Biol.*, 147:5 1097-108, 1999
 43. Lawton, D.M., Andrew, J. G., Marsh, D. R., Hoyland, J. A., and Freemont, A. J. : Expression of the gene encoding the matrix gla protein by mature osteoblasts in human fracture non-unions. *J. Mol. Pathol.*, 52:2 92-6, 1999

The effect of dexamethasone on the gene expression of the bone matrix protein in the periodontal ligament cells

Ha-Bong Chung, Jin-Woo Park, Jo-Young Suh

Department of Periodontology College of Dentistry Kyungpook National University

The purpose of this study were to determine that dexamethasone(Dex) induces differentiation of periodontal ligament(PDL) cells to osteoblastic cells and to investigate expression of matrix Gla protein(MGP), which is one of bone matrix protein.

The isolated human PDL cells and gingival fibroblasts were prepared and cultured. The fourth or sixth sub-passage cells were used in this experiments. control group, ascorbic acid and β -glycerophosphate treated group, ascorbic acid, β -glycerophosphate and 100nM Dex treated group, ascorbic acid, β -glycerophosphate, and 5 μ M Dex treated group were made for study.

The results were as follows:

Cellular morphological change of PDL cells according to time was investigated.

At first, the cells exhibited confluent monolayer of spindle or polygonal appearance. The multilayer of cells were seen after 7 days of treatment. After 14 days, the cells lost polarity and were densely packed.

The mineralized nodule formation was seen at 21 days in the only Dex treated PDL cell groups. In the gingival fibroblast groups and no Dex treated PDL cell groups, the mineralized nodule was not seen. The mineralized nodule formation of 5 μ M Dex treated group was higher than 100 nM Dex treated group.

Alkaline phosphatase(ALP) activity was higher in the Dex treated PDL cell groups of 14 and 21 days than 0 and 7 days.

MGP was expressed in the control and all experimental groups and the expression was constant at 0, 7, 14, 21 day.

The above results confirm that Dex is affected to differentiation of the PDL cells to osteoblastic or cementoblastic cells and has dose-dependent effect for mineralization. And, MGP is expressed in the PDL cells and is not affected to mineralization of PDL cells.