

치주인대섬유아세포가 파골세포분화에 미치는 영향

이 호 · 전용선 · 최승환 · 김형섭 · 오귀옥*

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

I. 서론

치주조직은 다양한 경조직과 연조직으로 구성되어 있는데, 그 구조로는 치은, 치주인대, 백악질 그리고 치조골이 있다.^{1, 2, 3)} 치주인대는 치근을 둘러싸고 있는 백악질과 치조골을 연결시키는 결합조직으로 영양공급과 신경전달에 관여하고 있다. 또한 치조골의 혈관통로를 통하여 골수강과 연결된다. 치조골은 지속적인 골형성과 흡수가 일어나는 역동적 조직이다.^{4, 5)} 그러므로 골 대사에 이상이 생기면 골 흡수와 골 형성의 불일치가 일어날 수 있다.

파골세포는 골흡수에 관여하는 주된 세포로 기능과 분화는 세포-세포간, 세포-기질간 접촉 그리고 수용성 인자에 의해 조절된다.^{6, 7, 8)} 이는 조혈전구세포의 분화에 의해 일어나는데 이전 연구에서 비장세포와 조골세포 또는 골수기질세포를 함께 배양해서 파골세포를 만들 수 있었다.^{9, 10)} 동시 배양시에 골흡수에 관여하는 촉진인자 즉 interleukin6(IL-6), IL-11, PTH, prostaglandin E₂, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 등의 존재시에 비장세포로부터 파골세포가 형성된다.¹¹⁾ 이들 인자들은 조골세포 또는 기질세포들이 osteoclastogenesis를 유도하도록 신호를 보내는 것으로 보여진다.¹¹⁻¹³⁾ 이 파골세포는 표지효소인 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)를 특징적으로 보여주고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 최근의 연구에 의하면 조골세

포 또는 기질세포의 세포표면 단백질인 osteoclast differentiation factor(ODF)가 파골전구세포의 수용체를 통하여 osteoclastogenesis를 촉진한다.¹¹⁻¹³⁾ ODF는 파골전구세포의 파골세포로의 분화에 중요한 신호를 보내는데, TNF-Related Activation-Induced Cytokine(TRANCE)/Receptor Activation of Nuclear Factor kB Ligand(RANKL)과 동일하고 T-cell growth와 dendritic cell의 기능을 증가시키는 것으로 보인다. 그러므로 ODF는 osteoclastogenesis와 면역기전에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 다른 연구에 의하면 인간폐섬유아세포의 조절된 배지에서 분리된 인자가 파골세포 분화와 기능을 억제 하는데 이를 osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF)라 하였다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 인간 OCIF의 염기서열은 tumor necrosis factor(TNFR) family의 일종인 osteoprotegerin(OPG)과 같다.^{20, 21)} OPG와 OCIF는 1,25-dihydroxyvitamin D₃, PTH 또는 IL-11에 의한 osteoclastogenesis signaling을 차단하고 성숙 파골세포의 파골활성도 억제한다. ODF는 osteoprotegerin(OPG)/OCIF에 대한 ligand이다.²²⁾

교정치료시 치주인대세포에서 유리된 cytokines에 의해 site-specific하게 골흡수와 형성이 일어나게 된다.^{23, 24)} 골수강에서 유래한 파골전구세포가 혈류를 따라 치주인대강으로 이주하여 성숙파골세포로 분화하여 치조골 흡수를 하게 된다.²⁵⁾ 임상적으로 유착

된 치아에서는 교정력에 의해 치아를 움직일수 없다²⁶⁾. 그러므로 치주인대세포가 교정치료시에 파골세포 형성에 있어 중요한 역할을 할 가능성이 있다.

치주질환은 결체조직과 치조골의 감소를 특징으로 하는 염증성 질환이다. 치조골 감소는 골생성 보다 골흡수가 더 커서 나타나게 되는데 치주인대의 주세포인 섬유아세포가 관여할 가능성이 있다. 치주인대의 주된 세포군인 치주인대섬유아세포는 조골세포에서 중요한 역할을 하는 alkaline phosphatase와 파골세포 분화억제인자인 OPG가 많이 발현된다고 최근 보고되어 치조골 대사에 중요한 역할을 할 것으로 예견된다. 그러므로 이번 연구의 목적은 치주인대섬유아세포가 조골세포/기질세포의 역할을 대신하여 골수의 단핵구에서 파골세포로의 분화를 유도할 수 있는지 밝힘으로써, 치주질환에서 치조골의 파괴에 대한 숙주세포의 역할을 분자수준에서 규명하고자 한다. 아울러 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포주가 파골전구세포로서 작용하는지를 밝힘으로써, 실험결과와 동일성과 간편성을 부여하기 위하여 골수의 줄기세포를 분화시켜 얻은 단핵구를 대신한 파골전구세포로 파골세포 분화에 관한 연구에서 이용할 수 있는지 여부도 밝히고자 실험하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포 배양

1) 치주인대섬유아세포(periodontal ligament fibroblast, PDLF) 분리 및 배양

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

2) M-CSF 의존형 골수세포 (M-CSF dependent bone marrow cell, MDBM) 분리 및 배양

MDBM 세포를 분리 배양하기 위하여 7~9주 된 웅성 생쥐를 경부염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였다. 장골의 양끝을 절단한 후 26G 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 0.1% collagenase (Type II, GibcoBRL, NY), 0.05% Trypsin (GibcoBRL, NY), 4mM EDTA (Sigma, MO) 효소 용액을 주사하여 골수를 적출해 내었다. 30분간 37°C에서 골수를 효소 용액으로 교반하여 세포를 모은 후 적혈구를 제거하고, 5 ng/ml recombinant mouse macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, PeproTech, UK)와 10% FBS가 포함된 α -MEM으로 100 mm 배양접시에 전 배양하였다. 24시간 후 미부착 세포를 모아 well 당 5×10^4 개의 세포가 되도록 분주하여 96 well plate에서 배양하였다. 8일간 50 ng/ml recombinant human soluble osteoclast differentiation factor (sODF, PeproTech, UK), 10 ng/ml M-CSF 및 1 ng/ml recombinant mouse transforming growth factor- β (TGF- β , PeproTech, UK)가 포함된 Minimum Essential Medium Alpha (α -MEM, GibcoBRL, NY)에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

3) RAW264.7 세포주 배양

RAW264.7 (mouse macrophage cell line) 세포주는 DMEM에 10% FBS 및 항생제를 첨가하여 배양하였다. RAW264.7 세포는 cell scraper로 세포배양접시에서 분리시키고, 원심 분리하여 세포의 밀도가 5,000 cells/well가 되도록 24 well plate에 분주하여 파골세포 분화실험 기간 동안은 10% FBS가 포함된 α -MEM에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

2. PDLF 세포의 자극, 고정 및 coculture

PDLF를 1 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide (LPS, Sigma, MO)로 8시간, 5 ng/ml IL-1 β (PeproTech, UK)로 8시간, 10^{-8}M 1,25(OH)₂D₃ (Biomol, PA) + 10^{-7}M dexamethasone (Sigma, MO)으로 3일간 각각 처리하였다.

처리 후 1% PFA/Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, GibcoBRL, NY)으로 10분간 고정하고 5회 이상 세척하여, 24시간 동안 clean bench내에서 건조시켜 RAW264.7 세포와의 coculture에 이용하였다.

3. 파골세포 특성 탐색

1) 파골세포 특이적 유전자의 발현 검사

① RNA 추출

RNeasy Mini Kit(QIAGEN, #74104)와 Tri reagent 용액 (TR-118, MRC Inc.)을 이용하여 다핵세포로 분화된 MDBM과 RAW264.7, 및 분화되지 않은 RAW264.7 세포로부터 제조회사의 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. 즉, 세포를 10ml의 PBS로 세척하고 Tri 시약에 10분간 혼합하여 세포를 용해한 후, Tri 시약 1ml 당 chloroform 200 μ l를 첨가하였다. 혼합물을 격렬하게 혼합한 다음 4°C에서 15분간 13,000rpm으로 원심분리하여 수용액 층만을 새 microtube에 옮겼다. Isopropanol을 동량 첨가한 후 1시간 이상 -20°C에서 방치하여 total RNA가 침전으로 가라앉게 한 다음, 4°C에서 15분간 13,000rpm으로 원심시켰다. RNA pellet을 75% ethanol로 세척한 다음, 건조시켜 diethyl pyrocarbonate(DEPC, Sigma, MO)로 처리한 증류수에 용해시켰다. RNA의 농도를 spectrophotometer로 측정하고, formaldehyde agarose gel electrophoresis로 추출한 RNA의 순도를 검사하였다.

② Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

분리한 total RNA를 oligo dT primer와 혼합하여 70°C로 10분간 가열하였다. first stranded cDNA가 형성되도록 하기 위하여 혼합물을 얼음에서 신속히 냉각시킨 다음, dithiothreitol (DTT), 0.5mM dNTP, 1 unit RNase inhibitor가 포함되어 있는 first strand buffer를 첨가하고 42°C에서 2분간 pre-warm시켰다. Superscript II Reverse Transcriptase (GibcoBRL, NY)를 가하여 42°C에서 50분간 반응을 시켰다. 2 pmol

forward와 reverse primers, 1mM MgCl₂, 0.1mM dNTP, 그리고 2 unit Taq polymerase (Koma biotech)를 포함하여 최종 부피 25 μ l의 혼합물에서 cDNA의 PCR을 시행시켰다. 본 RT-PCR에서 사용한 oligonucleotides는 c-fms (M-CSF receptor) (sense; 5'-gaagaaatgtgctgcagggg-3', antisense; 5'-agacttggtgtcactagca-3'), RANK (sense; 5'-ccagcaggcaagcctgag-3', antisense; 5'-tcttcaccagctcgagct-3'), calcitonin receptor (sense; 5'-gtgaaaaggcgaatct-3', antisense; 5'-aggaacatgtgctgtg-3'), 그리고 calthepsin K (sense; 5'-tcaaggttctgctgcta-3', antisense; 5'-gagccaa-gagagcatat-3')였다. PCR은 predenaturation : 95°C 5분, denaturation : 95°C 1분, annealing : 55°C 1분, extension: 72°C 1분, post extension: 72°C 5분의 조건으로 35 cycle 수행하였다. 최종적으로 DNA molecular weight marker와 함께 1.0% agarose gel에 걸어서 ethidium bromide 염색한 후 PCR product의 분자 크기를 확인하였다.

2) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 조직 화학 검사

세포의 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고, DPBS로 세포를 세척한 다음 citrate-acetone-formaldehyde 용액으로 5분간 고정하였고, 37°C의 증류수로 세척한 후 TRAP kit (Sigma, MO)를 이용하여 TRAP 염색을 시행하였다. TRAP 염색은 기질인 naphthol AS-BI phosphate (Sigma, MO), 반응산물의 염색제인 fast garnet GBC base와 7 mM의 tartrate buffer (pH 5.0, Sigma, MO)가 포함된 acetate buffer (pH 5.0, Sigma, MO)로 37°C에서 1시간 반응시켜 효소활성을 검사하였으며, 염색된 세포는 광학현미경상에서 관찰하여 3개 이상의 핵을 포함한 TRAP 양성인 다핵세포의 수를 계산하였다.

3) 글흡수와 검사 (resorption pit assay)

파골세포의 활성을 검사하기 위하여 수산화인회석으로 피막된 OAAS™ plate (OCT Inc., Korea)에서 세포배양을 한 후, 붙어있는 세포를 제거하기 위하여 5% sodium hypochlorite 용액을 넣어 5분간 처리한

다음 증류수로 세척하였다. 흡수된 OAAS 부위를 광학현미경과 digital 카메라로 관찰하여 image-pro plus™ (version 6.01, USA) 프로그램을 이용하여 전체 흡수와의 수와 흡수와의 면적을 측정하였다.

III. 결과

파골전구세포의 primary culture를 얻기 위하여, 마우스로부터 얻은 골수에서 기질세포는 제거한 나머지 세포 중 배양접시에 부착하는 세포만을 선택하여, M-CSF와 TGF- β 가 포함된 배양액에서 3일간 배양한 결과 방추형과 구형세포가 복합된 형태의 MDBM을 얻었다 (Fig. 1A). 파골전구세포의 세포주로서는 마우스 대식세포주인 RAW264.7을 이용하였다(Figure 1B).

Primary 파골전구세포라고 할 수 있는 MDBM을 50 μ g/ml의 sODF, 10ng/ml의 M-CSF, 및 1ng/ml의 TGF- β 이 포함된 배양액에서 6일간 배양하면 여러 개의 핵이 융합된 다핵거대세포가 형성되며, 이것을 TRAP 염색하면 파골세포의 특징적 형태중 하나인 TRAP(+) multinucleated cells(MNCs) 양상을 띄게 된다 (Figure 2A). 파골전구세포주인 RAW264.7의 경

우 M-CSF 없이도 sODF 50ng/ml이 첨가된 α -MEM에서 5일간 배양하면 특징적인 TRAP(+) MNCs이 나타난다 (Figure 2B). 그러나 MDBM에서 형성된 TRAP(+) MNCs은 거대세포의 주변으로 핵이 밀려나 있지만 RAW264.7에서 형성된 TRAP(+) MNCs은 핵들이 거대세포 중앙부위로 모이는 반대 양상을 나타내었다.

MDBM과 RAW264.7에서 형성된 MNCs들에서 파골세포 특이적인 유전자의 발현이 있는지를 관찰하고자 cathepsin K, RANK, calcitonin receptor, c-fms(M-CSF receptor)에 대한 RT-PCR을 시행하였다. MDBM에 sODF와 M-CSF 및 TGF- β 를 처리하여 MNCs이 형성된 경우, 4가지 mRNA의 발현이 모두 뚜렷이 나타났다. 또한 RAW264.7에 sODF를 처리하여 MNCs이 형성된 경우에서도 MDBM과 마찬가지로 4가지 mRNA의 발현이 뚜렷하여 primary culture와 세포주에서 형성된 MNCs이 모두 파골세포의 특징적 유전자발현을 나타내었다. 한편 매우 특이하게도, 파골세포로 분화하기 전의 RAW264.7에서 파골세포와 유사한 유전자 발현양상을 나타내었으며, calcitonin receptor mRNA발현만 파골세포로 분화된 후에 비하여 약간 적게 나타났을 뿐이었다 (Figure 3).

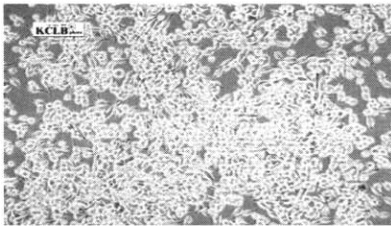


Figure 1A, Microscopic feature of MDBM cells

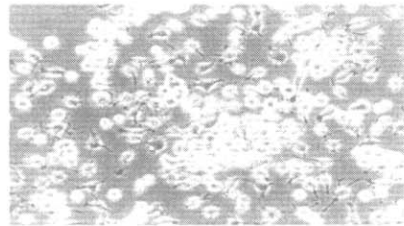


Figure 1B, Microscopic feature of RAW264.7 cells

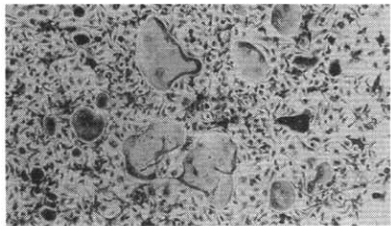


Figure 2A, TRAP(+) MNCs formation from MDBM cells

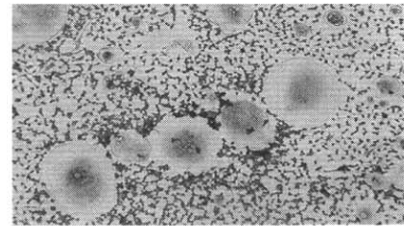


Figure 2B, TRAP(+) MNCs formation from RAW264.7 cells

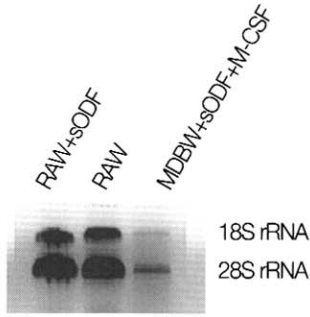


Figure 3A. Total RNA was extracted from MDBM-derived(MDBM+sODF+M-CSF) RAW 264.7-derived(RAW+sODF) MNCs, and RAW 264.7 cells for RT-PCR analysis.

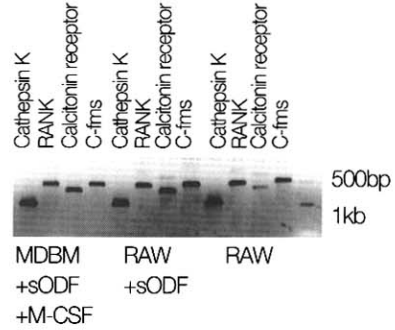


Figure 3B. Comparison of mRNA expression of cathepsin K, RANK, calcitonin receptor, and c-fms between MDBM-or RAW 264.7-derived MNCs.

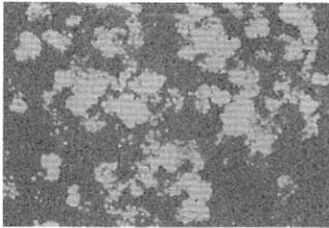


Figure 4A. Resorption pits formation by MDBM-derived MNCs



Figure 4B. Resorption pits formation by RAW264.7-derived MNCs.

Figure 4는 MDBM과 RAW264.7에서 분화된 MNCs들이 골흡수의 기능을 나타내는지 확인한 실험결과이다. 골흡수기능을 관찰하기 위하여 본실험에서는 흔히 쓰이는 dentin slice 대신 calcium phosphate 초박막 코팅 24 well culture plate에 세포를 배양한 후, 세포를 제거한 다음 흡수된 calcium phosphate 코팅을 현미경으로 관찰하였다. 투명한 부분 (clear zone)이 세포에 의하여 calcium phosphate 코팅이 용해된 부분(resorption pits)이다. MDBM과 RAW264.7에서 형성된 MNCs들이 모두 골흡수 기능을 하고 있었으며, RAW264.7에서 형성된 파골세포는 MDBM에서 형성된 파골세포와는 달리 코팅두께의 일부만 용해한 경우가 많이 관찰되었다. 즉, resorption area가 반투명해진 결과를 나타내었다.

RAW264.7을 sODF로 처리하여 형성된 resorption area는 ODF의 decoy receptor인 OPG를 같이 처리

하였을 경우, 완전히 대조군의 값으로 억제되었다. 독특한 것은 분화되지 않은 RAW264.7 대조군의 경우에서도 미약하기는 하나 골흡수 기능이 관찰된 것이며, ODF에 의한 osteoclastogenesis를 OPG로 완전히 차단한 경우에도 미약한 골흡수기능이 아직 관찰된다는 점이다 (Figure 5).

PDLF cell이 sODF의 역할을 대신하여 RAW264.7 세포에서 파골세포를 형성시키는 작용이 있는지 관찰하기 위하여, sODF 없이 PDLF와 RAW264.7 세포만 coculture 하여 TRAP 염색해 보았다. sODF 만큼 효과적이지는 않았지만, PDLF가 sODF를 대신하여 RAW264.7에서 파골세포 형성을 유도한다는 사실이 관찰되었다 (Figure 6).

PDLF가 분비할지도 모르는 수용성인자들의 역할을 배제하기 위하여 PDLF를 paraformaldehyde로 고정한 다음 RAW264.7세포와 coculture 하여 보았다.

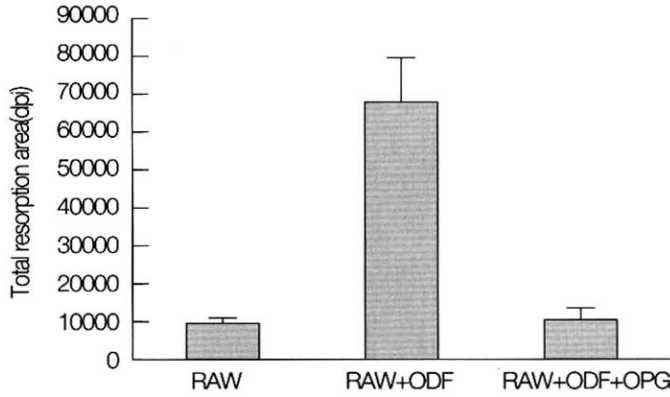


Figure 5. Resorption pits formed by RAW264.7-derived osteoclasts were completely blocked by OPG treatment.

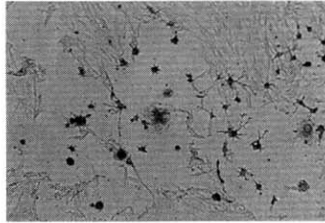


Figure 6. TRAP(+) MNCs formation in coculture system of RAW 264.7 with PDLF cells.

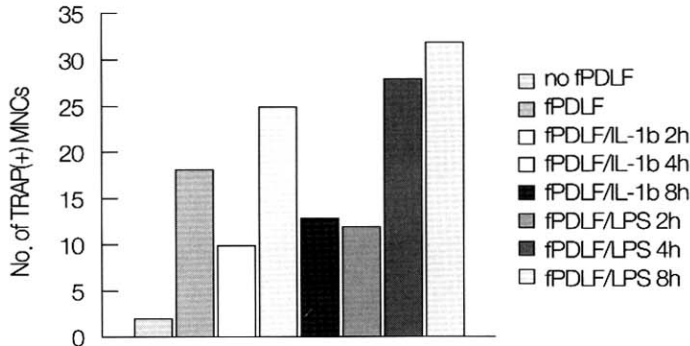


Figure 7. Effects of activated and then fixed PDLF cells on the osteoclast generation from RAW 264.7 cells.

이 경우에는 ODF와 같이 PDLF의 세포막에 존재하는 세포막 단백질들만이 RAW264.7에 영향을 줄 수 있다. RAW264.7 단독으로 배양하였을 경우 2개의 TRAP(+) MNCs이 관찰되는데 비하여, 고정된 PDLF(fPDLF)와 RAW264.7을 coculture 한 경우에는 18개로 증가하여, fPDLF의 세포막 단백질 중에서 그

어떤 것이 RAW264.7 세포에 대하여 파골세포로의 분화를 유도한다고 볼 수 있었다. ODF의 세포막 발현에 영향을 줄 수 있는 IL-1 β 와 LPS등을 PDLF에 처리한 후 세포를 고정시켜 RAW264.7과 coculture 한 결과, IL-1 β 처리한 PDLF는 4시간째에 25개의 TRAP(+) MNCs로 최고값을 나타내었으며, LPS 처리

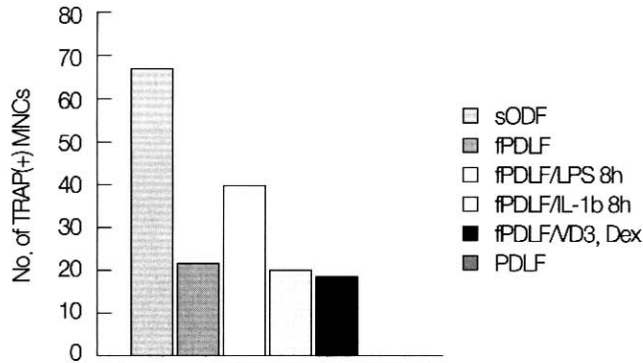


Figure 8. Comparison of osteoclastogenic effects of sODF, fixed PDLF, and PDLF on the RAW 264.7 cell culture.

한 PDLF는 8시간째에 32개의 TRAP(+) MNCs 로 최대치를 나타내었다 (Figure 7).

fPDLF와 sODF의 파골세포분화 유도능을 비교하여 보면, sODF는 78개의 TRAP(+) MNCs을 형성시켰으며, fPDLF는 21개로 sODF에는 훨씬 못 미쳤으나, LPS로 자극한 fPDLF는 40개의 TRAP(+) MNCs을 형성시켜, 파골세포 분화유도인자의 PDLF 세포막 발현을 LPS가 증가시켰음을 나타내었다. 그러나 고정하지 않은 PDLF는 TRAP(+) MNCs가 한 개도 형성되지 않았으며, 이는 파골세포 분화를 억제하는 수용성 분자를 PDLF가 분비하고 있음을 간접적으로 나타내는 결과였다 (Figure 8).

IV. 고찰

치주질환은 치조골 파괴를 특징으로 하는 염증성 질환으로 골형성과 골흡수의 균형이 깨짐으로서 나타나게 된다. 건강한 치주조직에 있어 치주인대세포들은 치조골을 보호할 수 있는데 치주질환에 있어서는 치조골 파괴가 일어나므로 osteolytic cytokines에 의해 자극 받은 치주인대세포들이 osteoclastogenesis를 억제하는 작용에 변경이 올 가능성을 생각할 수 있다.

치조골 파괴는 골흡수의 주세포인 파골세포의 활성화에 의해 일어나게 된다. 파골세포는 monocyte-macrophage lineage의 hemopoietic cell에서 유래하는 다핵세포이다. 파골세포의 분화에는 조골세포와

의 세포-세포간 접촉이 파골전구세포가 파골세포로 분화하는데 필수적인 것으로 보고되었다. 조골세포는 파골전구세포를 파골세포로 분화시키고 성숙파골세포를 활성화 시키는 것으로 보여진다. 이러한 작용은 조골세포가 분비하는 ODF/RANKL/OPGL과 같은 세포표면 단백질이 관여하는 것으로 보인다. 또한 기질세포 또는 조골세포가 분비하는 soluble factor인 M-CSF(macrophage-colony stimulating factor)도 ODF에 의한 파골세포 형성에 필수적인 것으로 보인다. OPG/OCIF는 TNF family receptor로서 ODF를 masking함으로써 osteoclastogenesis를 억제하는 것으로 보인다.

최근의 연구에 따르면 치주인대세포가 교정치료시에 골흡수에 중요한 역할을 할 것이라는 보고가 있었고 치주인대섬유아세포가 osteoblastic phenotype을 보여주고 osteoblastic lineage cells로 분화된다는 보고가 있었다. 그러므로 이번 연구의 목표는 치주인대섬유아세포가 조골세포처럼 파골세포의 분화에 관여하는지와 RAW264.7 cell(macrophage cell line)이 파골전구세포로서 골수의 단핵구와 같은 역할을 할 수 있는지를 밝히는 것이다.

실험모델로는 마우스에서 얻은 골수를 이용하여 M-CSF dependent cell(MDBM)과 RAW264.7 cell을 파골전구세포주로 이용하였고, 교정치료를 위해 발거한 건강한 치아에서 얻은 치주인대섬유아세포를 coculture하였다. ODF처리와 coculture를 시행하여 얻은 세포들의 파골세포의 특성을 검사하기 위하여

파골세포 특이적 유전자 발현검사(RT-PCR)와 파골세포의 특징적인 enzyme marker를 확인하는 Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 조직화학 검사를 시행하였다. 그리고 파골세포의 실제적인 골흡수능을 확인하기 위하여 dentin slice 대신에 수산화인석으로 피막된 OAAS™plate(OCT Inc., Korea)를 골흡수와 검사에 이용하였다.

Primary 파골전구세포라고 할 수 있는 MDBM을 50 µg/ml의 sODF, 10ng/ml의 M-CSF, 및 1ng/ml의 TGF-β이 포함된 배양액에서 6일간 배양하면 여러 개의 핵이 융합된 다핵거대세포가 형성되었고, 파골전구세포주인 RAW264.7의 경우 M-CSF 없이도 sODF 50ng/ml를 첨가시켜 배양한 결과 다핵거대세포가 발현되었다. 양 군에서 TRAP염색한 결과 특징적인 TRAP(+) MNCs가 나타나 ODF와 M-CSF가 파골세포의 분화에 중요한 역할을 한다는 것을 보여주고 있다.

MDBM과 RAW264.7로부터 형성된 MNCs들에서 파골세포의 특이적인 유전자 발현이 있는지를 관찰하고자 cathepsin K, RANK, calcitonin receptor, c-fms(M-CSF receptor)에 대한 RT-PCR을 시행하였는데, MDBM-derived, RAW-derived MNCs의 4가지 mRNA에서 파골세포의 특징적인 유전자 발현을 보였다. 한편 매우 특이하게도, 파골세포로 분화하기 전의 RAW264.7에서 파골세포와 유사한 유전자 발현양상을 나타내었으며, calcitonin receptor mRNA 발현만 파골세포로 분화된 후에 비하여 약간 적게 나타났을 뿐이었다. Calcitonin receptor는 파골세포의 분화를 나타내는 표지인자로 흔히 이용된다. 즉 파골전구세포에서 골흡수기능을 갖춘 파골세포로 분화될 때 calcitonin receptor가 세포막에 발현된다. 따라서 RAW264.7이 파골세포 분화 이전에 이미 calcitonin receptor mRNA를 발현한 것은 이 세포주가 다른 단핵구/대식세포주에 비하여 파골세포로 매우 쉽게 분화된다는 특성과도 관련이 있을 것으로 추정되며, 앞으로 연구해 볼만한 흥미로운 부분이다.

MDBM과 RAW264.7에서 형성된 MNCs들이 파골세포의 특이적 표현형을 나타내기는 하지만, 파골세포로서의 기능, 즉 골흡수 기능을 나타내지 않으면

엄밀한 의미의 파골세포라고 할 수 없다. 골흡수기능을 관찰하기 위하여 calcium phosphate 조박막 코팅 24 well culture plate에 세포를 배양한 후, 세포를 제거한 다음 흡수된 calcium phosphate코팅을 현미경으로 관찰하였다. 투명한 부분(clear zone)이 세포에 의하여 calcium phosphate 코팅이 용해된 부분(resorption pits)이다. MDBM과 RAW264.7에서 형성된 MNCs들이 모두 골흡수 기능을 하고 있었으며, RAW264.7에서 형성된 파골세포는 MDBM에서 형성된 파골세포와는 달리 코팅두께의 일부만 용해한 경우가 많이 관찰되었다. 즉, resorption area가 반투명해진 결과를 나타내었다. 이러한 현상은 RAW264.7에서 유래한 파골세포의 골흡수능이 MDBM에 비하여 약하거나, 아니면 빠른 apoptosis (programmed cell death)에 의하여 흡수가 앞게 일어난 것이 아닌가 추정되지만 아직 단정할 수는 없다.

RAW264.7을 sODF로 처리하여 형성된 resorption area는 ODF의 decoy receptor인 OPG를 같이 처리하였을 경우, 완전히 대조군의 값으로 억제되었다. 이는 OPG가 osteoblast, stromal cell-derived ODF-signal을 차단한다는 이전의 결과와 일치한다. 독특한 것은 분화되지 않은 RAW264.7 대조군의 경우에서도 미약하기는 하나 골흡수 기능이 관찰된 것이며, ODF에 의한 osteoclastogenesis를 OPG로 완전히 차단한 경우에도 미약한 골흡수기능이 아직 관찰된다는 점이다. 반복확인해 보아야 하겠지만 ODF-independent한 파골세포분화 유도 system이 있지 않는지 의심된다.

PDLF cell이 osteoblastic phenotype을 보인다는 보고가 있었으므로 sODF의 역할을 대신하여 RAW264.7를 파골세포로 분화시키는 작용이 있는지 관찰하기 위하여, sODF 없이 PDLF와 RAW264.7세포만 coculture 하여 TRAP 염색을 시행하였다. sODF 만큼 효과적이지는 않았지만, PDLF가 sODF를 대신하여 RAW264.7에서 파골세포 형성을 유도한다는 사실이 관찰되었다. 이러한 결과는 치주인대섬유아세포가 RAW264.7의 파골세포로의 분화에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

PDLF의 수용성인자들의 역할을 배제하기 위하여

PDLF를 paraformaldehyde로 고정 한 다음 RAW264.7 세포와 coculture 하여 보았다. 이렇게 고정한 경우에는 ODF와 같이 PDLF의 세포막에 존재하는 세포막 단백질들이 RAW264.7에 영향을 줄 수 있다. RAW264.7 단독으로 배양하였을 경우 2개의 TRAP(+) MNCs이 관찰된데 비하여, 고정된 PDLF(fPDLF)와 RAW264.7을 coculture 한 경우에는 18개로 증가하여, fPDLF의 세포막 단백질 중에서 어떤 것이 RAW264.7 세포에 대하여 파골세포로의 분화를 유도한다고 볼 수 있었다. ODF의 세포막 발현에 영향을 줄 수 있는 IL-1 β 와 LPS등을 PDLF에 처리한 후 세포를 고정시켜 RAW264.7과 coculture 한 결과, IL-1 β 처리한 PDLF는 4시간째에 25개의 TRAP(+) MNCs로 최고값을 나타내었으며, LPS 처리한 PDLF는 8시간째에 32개의 TRAP(+) MNCs로 최대치를 나타내었다. fPDLF와 sODF의 파골세포분화 유도능을 비교하여 보면, sODF는 78개의 TRAP(+) MNCs를 형성시켰으며, fPDLF는 21개로 sODF에는 훨씬 못 미쳤으나, LPS로 자극한 fPDLF는 40개의 TRAP(+) MNCs를 형성시켜, 파골세포 분화유도인자의 PDLF 세포막 발현을 LPS가 증가시켰음을 나타내었다. 그러나 고정하지 않은 PDLF는 TRAP(+) MNCs가 한 개도 형성되지 않았다. 이번 결과에서 보면 PDLF를 고정한 경우 PDLF의 세포막에 존재하는 세포막 단백질들이 영향을 미쳤으므로, osteoblastic cell과 파골전구세포의 세포-세포간 접촉에 의해 이루어지는 기전과 같은 것으로 파골세포분화를 일으킨다고 볼 수 있으며 ODF-mediated에 의한 것으로 보인다. 또한 치주 질환 시에 osteotropic hormone(IL-1 β , LPS등)들이 나타나게 되는데 이번 결과는 치조골흡수의 증가와 관련성을 보여주고 있다. 그리고 고정하지 않은 PDLF는 TRAP(+)MNCs가 전혀 형성되지 않았는데 이는 파골세포 분화를 억제하는 수용성 분자를 PDLF가 분비하고 있음을 간접적으로 나타내는 결과였다. 현재로서 가장 가능성 있는 억제인자로는 OPG일 것으로 추정된다. 따라서 치주조직에서 파골세포 분화조절인자들이 치조골의 골 항상성을 유지하며, 염증상태에서 이들에 대한 발현을 기염증성 물질이 변화시킴으로써 치주질환시

치조골의 파괴가 일어나며, 이에 치주인대섬유아세포가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

앞으로 치주인대섬유아세포의 파골세포 분화조절 인자들의 발현에 관한 분자수준의 연구를 통하여 치주질환의 골흡수를 억제할 수 있는 예방 및 치료약물이 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결론

치주인대섬유아세포(PDLF)는 치조골에 인접하고 있어 골대사와 밀접한 관계를 가지고 있으며, 조골세포와 유사한 표현형을 지니고 있다. 최근 조골세포가 발현하는 세포막단백질 ODF와 분비형 단백질 OPG가 파골세포의 분화 및 활성화에 가장 중요한 역할을 한다는 것이 알려졌다. 이에 파골세포의 분화에서 PDLF가 조골세포와 같은 역할을 하는지 관찰하여 치주질환의 골흡수 기전을 밝히고자 본 실험을 시행하였다. 마우스 골수에서 얻은 파골전구세포인 M-CSF 의존형 골수세포 (MDBM)를 대신할 수 있는 세포주로서, RAW264.7을 선택하여 MDBM과 RAW264.7의 파골세포로의 분화양상을 관찰하였다. 또한 PDLF세포가 sODF의 존재를 대신하여 RAW264.7를 파골세포로 분화 유도하는지 관찰하기 위하여 RAW264.7과 PDLF를 coculture하였다.

1. 마우스 대식세포주 RAW264.7는 ODF 처리에 의하여 파골전구세포인 MDBM과 동일하게 파골세포로 분화유도 되었다. 즉, TRAP(+) MNCs의 형성, 파골세포 특이적 유전자 발현양상 (cathepsin K, RANK, calcitonin receptor, c-fms), 골흡수기능등, 모든 면에서 MDBM으로부터 유래한 파골세포와 동일한 양상을 나타내어, RAW264.7을 파골전구세포주로서 실험에 이용할 수 있었다.
2. ODF처리에 의하여 RAW264.7로부터 형성된 MNCs의 골흡수능은 OPG를 ODF와 동시에 처리함으로써 완전 차단되었다.
3. 고정된 PDLF (fPDLF)와 RAW264.7을 coculture 하면 sODF를 처리하지 않아도 RAW264.7로부

터 TRAP(+) MNCs의 형성이 촉진되었다.

4. IL-1 β , LPS로 자극하여 고정된 PDLF를 RAW264.7과 coculture 하면 자극하지 않은 PDLF의 경우보다 약 2배의 TRAP(+) MNCs이 형성되었다.
5. 고정하지 않은 PDLF는 RAW264.7과 coculture 하여도 전혀 TRAP(+) MNCs이 형성되지 않았다.

이상의 결과로부터, 조골세포가 ODF, OPG 발현에 의하여 파골세포 분화를 조절하는 기전과 매우 유사한 기전을 통하여 PDLF도 파골세포 분화조절에 기여하는 것으로 여겨지며, 치주조직에서 ODF, RANK, OPG의 관계를 규명함으로써 치주질환에서 골흡수 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Melcher, A.H. Cellular Activity in Adaptation of the Periodontium. In: Malocclusion and the Periodontium, J.A. McNamara, Jr., and K.A. Ribbens, Eds., Craniofacial Growth Series Monograph No. 15 Ann Arbor, Michigan: University of Michigan Press, 1984; 1-15.
2. Vignery A, Baron A. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodelling in the adult rat. *Anat Rec* 1991;196:191-200.
3. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanical during periodontal development and wound healing. *J Periodont Res* 1994; 29:81-94.
4. Suda, T., Udagawa, N., and Takahashi, N. () Cells of Bone: steoclast generation, Academic Press, San Diego 1996.
5. Roodman, G. D. *Endocr Rev* 1996;17, 308-332.
6. Väänänen, K in Principles of Bone Biology (Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., and Rodan, G. A., Eds) 1996; 103-113, Academic Press, San Diego.
7. Suda, T., Udagawa, N., and Takahashi, N. in Principles of Bone Biology (Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., and Rodan, G. A., Eds) 1996;87-102, Academic Press, San Diego.
8. Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T.J. *Endocrin Rev* 1995;4, 266-270
9. Takahashi, N. Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J. & Suda, T. *Endocrinology* 1988;123, 2600-2602.
10. Udagawa, N. Takahashi, N. Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., Martin, T. J. & Suda, T. *Endocrinology* 1989;125, 1805-1813.
11. Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T.J. *Endocrin Rev* 1992;13, 66-80.
12. Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T.J. in *Endocrine Review Monographs*, eds, Bikle, D. D, & Negrovillar, A. (Endocrine Soc., Bethesda), Vol 4 1995; 266-270.
13. Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C. & Takahashi, N. *Bone* 1995;17, 87S-91S.
14. Ibbotson, K.J., Roodman, G.D., Mcmanus, L.M., Mundy, G.R. Identification and characterization of osteoclast-like cells and their progenitors in cultures of feline marrow mononuclear cells. *J Cell Biol* 1984;99:471.
15. Roodman, G.D., Ibbotson, K.J., MacDonald, B.R., Kuehl, T.J., Mundy, G.R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8213.
16. MacDonald, B.R., Takahashi, N., McManus, L.M., Holahan, J., Mundy, G.R., Rodman, G.D. Formation of multinucleated cells which respond to osteotropic hormones in long-term human marrow cultures. *Endocrinology* 1987;120:23-26.
17. Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis.

- Biochem. Biophys. Res Commun 1997;234:137-142.
18. Yamamoto, M., Murakami, T., Nishikawa, M. Hypocalcemic effect of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in the parathyroidectomized rat *Endocrinology* 1998;139:4012-4015.
 19. Hakeda, Y., Kobayashi Y, Yamaguchi, K. Osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem. Biophys Res Commun*, 1998;251:796-801.
 20. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF) and osteoprotegerin(OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-1337.
 21. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R. () steoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-319.
 22. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol 1998;95, 3597-3602.
 23. Davidovitch, Z. Tooth movement. *Crit. Rev. Oral. Biol Med* 1991;2:411-450.
 24. Lekic, P., McCulloch, C.A. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996;245:327-341.
 25. Roberts, W.E., Goodwin, W.C. Jr, Heiner, S.R. Cellular response to orthodontic force. *Dent. Clin. North Am* 1981;25:3-17.
 26. Mitchell, D.L., West, J.D. Attempted orthodontic movement in the presence of suspected ankylosis. *Am J Orthod* 1975;68:404-411.

Human Periodontal Ligament Fibroblasts Support the Osteoclastogenesis of RAW264.7 Cells

Ho Lee, Yong-Seon Jeon, Seoung-Hwan Choi, Hyung-Seop Kim, Kwi-Ok Oh*

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

The fibroblasts are the principal cells in the periodontal ligament of periodontium. As the periodontal ligament fibroblasts (PDLF) show similar phenotype with osteoblasts, the PDLF are thought to play an important role in alveolar bone remodeling. Cell-to-cell contacted signaling is crucial for osteoclast formation. Recently it has been reported that PDLF enhance the bone resorbing activity of osteoclasts differentiated from hematopoietic preosteoclasts. The aims of this study were to clarify¹⁾ the mechanism of PDLF-induced osteoclastogenesis and ²⁾ whether we can use preosteoclast cell line instead of primary hematopoietic preosteoclast cells for studying the mechanism of PDLF-induced osteoclastogenesis. Osteoclastic differentiation of mouse macrophage cell line RAW264.7 was compared with that of mouse bone marrow-derived M-CSF dependent cell (MDBM), a well-known hematopoietic preosteoclast model, by examining, 1) osteoclast-specific gene expression such as calcitonin receptor, M-CSF receptor (c-fms), cathepsin K, receptor activator nuclear factor kappa B (RANK), 2) generation of TRAP(+) multinucleated cells (MNCs), and 3) generation of resorption pit on the OAAS™ plate. RAW264.7 cultured in the medium containing of soluble osteoclast differentiation factor (sODF) showed similar phenotype with MDBM-derived osteoclasts, those are mRNA expression pattern of osteoclast-specific genes, TRAP(+) MNCs generation, and bone resorbing activity. Formation of resorption pits by osteoclastic MNCs differentiated from sODF-treated RAW264.7, was completely blocked by the addition of osteoprotegerin (OPG), a soluble decoy receptor for ODF, to the sODF-containing culture medium. The effects of PDLF on differentiation of RAW264.7 into the TRAP(+) multinucleated osteoclast-like cells were examined using coculture system. PDLF were fixed with paraformaldehyde, followed by coculture with RAW264.7, which induced formation of TRAP(+) MNCs in the absence of additional treatment of sODF. When compared with untreated and fixed PDLF (fPDLF), IL-1 β -treated, or lipopolysaccharide-treated and then fixed PDLF showed two-fold increase in the supporting activity of osteoclastogenesis from RAW264.7 coculture system. There were no TRAP(+) MNCs formation in coculture system of RAW264.7 with PDLF of no fixation. These findings suggested that we can replace the primary hematopoietic preosteoclasts for RAW264.7 cell line for studying the mechanism of PDLF-induced osteoclastogenesis, and we hypothesize that PDLF control osteoclastogenesis through ODF expression which might be enhanced by inflammatory signals.

Key words : periodontal ligament fibroblast, Osteoclastogenesis