

MicroRNA Analysis during Cultured Odontoblast Differentiation

Min-Gyeong Park¹, Myoung-Hwa Lee¹, Sun-Kyoung Yu¹, Euteum Park¹, Seog Kim¹, Seul-Ah Lee¹,
Yeon-Hee Moon², Heung-Joong Kim¹, Chun Sung Kim¹, and Do Kyung Kim^{1*}

¹Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

²Department of Dental hygiene, Chodang University, Muan 534-701, Republic of Korea

(received August 31, 2012 ; revised September 11, 2012 ; accepted September 11, 2012)

MicroRNAs (miRNAs, miRs) are about 21-25 nucleotides in length and regulate mRNA translation by base pairing to partially complementary sites, predominantly in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the target mRNA. In this study, the expression profile of miRNAs was compared and analyzed for the establishment of miRNA-related odontoblast differentiation using MDPC-23 cells derived from mouse dental papilla cells. To determine the expression profile of miRNAs during the differentiation of MDPC-23 cells, we employed miRNA microarray analysis, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Alizaline red-S staining. In the miRNA microarray analysis, 11 miRNAs were found to be up- or down-regulated more than 3-fold between day 0 (control) and day 5 of MDPC-23 cell differentiation among the 1,769 miRNAs examined. In qRT-PCR analysis, the expression levels of two of these molecules, miR-194 and miR-126, were increased and decreased in the control MDPC-23 cells compared with the MDPC-23 cells at day 5 of differentiation, respectively. Importantly, the overexpression of miR-194 significantly accelerated mineralization compared with the control cultures during the differentiation of MDPC-23 cells. These results suggest that the miR-194 augments MDPC-23 cell differentiation, and potentially accelerates the mineralization process. Moreover, these *in vitro* results show that different miRNAs are deregulated during the differentiation of MDPC-23 cells, suggesting the involvement of these genes in the differentiation and mineralization of odontoblasts.

Key words: miRNA, odontoblast, differentiation, microarray

서 론

생체에서 내인성으로 존재하는 miRNA(miRNA, miR)는 종간에도 잘 보존되어 있으며, 21-25개의 염기서열로 구성된 매우 작은 noncoding RNA 분자로 알려져 있다 [1-3]. miRNA는 RNA 간섭을 통하여 기능을 나타내는데, 주로 표적 유전자의 3'-UTR 결합부위에 상보적인 염기 서열을 가지면서 그 표적유전자의 단백질합성을 억제하거나 촉진시킨다[4-6]. 또한 miRNA는 진핵세포 내에서 다양한 유전자를 조절함으로써 세포분화, 성장과 증식 등 대부분의 생명현상에 관여하는 것으로 보고되고 있다[2-6].

상아질은 치아의 중요한 성분으로 치관과 치근의 대부분을 구성하며, 상아질모세포는 제 I형과 II형 교원질과 같은 유기기질과 당단백 및 dentin sialophosphoprotein을 합성하여 분비한다[7]. 상아질에 기질이 침착됨에 따라 상아질모세포가 세포질 돌기들을 원심 쪽으로 내어 상아세판에 묻히게 되고, 결과적으로 상아질모세포는 치수 가장자리 상아질의 내면에 위치하여 상아질을 유지하게 된다[8]. 그러나 상아질모세포의 분화기전과 상아질의 형성 과정을 조절하는 인자 그리고 그와 관련된 분자생물학적 기전은 아직까지 명확히 알려져 있지 않다.

상아질 재생이란 외상 또는 치아우식 등에 의해 손상된 상아질을 재형성하게 하여 치아가 건강하게 유지되도록 하는 것으로, 최근 상아질 재생에 대한 관심이 높아

*Correspondence to: Do Kyung Kim, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Chosun University, #375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea, Tel: 82-62-230-6893, E-mail: kdk@chosun.ac.kr

지면서 이와 관련한 연구가 활발히 진행되고 있으나 상아질의 특수성과 여러 가지 실험적 제한으로 인하여 연구결과는 미미한 실정이다[9]. 따라서 생물공학·조직공학을 이용한 상아질 재생 유도물질의 개발이 향후 상아질 재생연구의 핵심이 될 것으로 사료되며[9], 이를 위해서는 상아질모세포의 분화기전을 이해하는 것이 필수요소라 생각된다.

상아질모세포 연구에 널리 이용되고 있는 MDPC-23 세포주는 Hanks 등[10,11]이 CD-1 생쥐 어금니의 치유두를 이용하여 만든 세포주로서, 일정조건에서 배양하면 상아질모세포의 특성을 나타낸다는 것을 확인한 세포주이다[12].

miRNA는 컴퓨터 데이터베이스 상으로는 다양한 표적 유전자가 예측되어 있으나, 실제 기능이나 표적유전자에 대한 연구는 거의 되어 있지 않다. 따라서 miRNA가 발현되는 조직이나 세포, 더 나아가 miRNA의 발현을 조절하는 단백질이나 신호전달에 대한 연구가 절실히 필요하며, 특히 상아질모세포에서 miRNA 연구는 매우 부족하다. 따라서 본 연구에서는 상아질모세포로서 MDPC-23 세포주의 분화과정에서 miRNA들의 발현을 비교·분석하여 상아질모세포의 분화에 특이적인 miRNA를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

miScript reverse transcription kit, miRNeasy mini kit, Mispript SYBR green PCR kit 및 Attractene transfection reagent는 Qiagen(Valencia, CA, USA)에서 구입하여 사용하였고, pSUPER basic vector는 Oligoengine Inc.(Seattle, Washington, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

상아질모세포의 배양과 분화

본 연구에서는 상아질모세포로서 생쥐 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아질세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주[10,11]를 실험에 이용하였다. MDPC-23 세포주를 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제(penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100µg/ml, gentamycin 50µg/ml, fungizone 2.5µg/ml)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM)에 배양하였으며, 세포분화와 석회화유도를 위하여, 동일배지에 ascorbic acid(50µL/ml)와 β-glycerophosphate(10mM)를 첨가하여 배양하면서 실험에 이용하였다[13].

MicroRNA(miRNA) 추출

세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 MDPC-23 세포주에서 miRNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 miRNA를 분리하고 정제하였다. 각 세포가 들어있는 1.5ml tube에 700µL의 세포용해액을 넣어 충분히 균질화 시키고 상온에서 5분 동안 반응시킨 후, 140µL의 chloroform을 첨가하여 15초간 혼합하였다. 상온에서 3분 동안 반응시킨 후, 4°C에서 15분간 12,000 x g로 원심분리 하였다. 상층액을 mini column으로 이동시켜 8,000 x g로 15초간 원심분리한 후, RWT buffer와 RPE buffer를 각각 처리하고 8,000 x g로 원심분리하여 miRNA 시료를 세척하였다. 시료가 들어있는 mini column을 RNA용 수집 tube로 이동시킨 후, 8,000 x g에서 1분간 원심분리하여 miRNA를 추출하였다. 추출한 miRNA를 Biophotometer(Eppendorf, Hamburg, Germany)으로 정량한 후 실험에 이용하였다.

miRNA microarray 및 결과분석

세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 MDPC-23 세포주에서 세포분화에 따른 miRNA 발현양상을 microarray 분석으로 확인하였다. 각 실험군의 MDPC-23 세포주에서 miRNA를 추출하여 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 각 세포별 miRNA microarray 영상을 스캔하였으며, 신호강도는 20-100 사이, 노이즈 강도는 5 이하인 조건을 만족하는 범위에서 실험을 진행하였다[14]. Affymetrix GCOS software(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 microarray 결과를 분석하였으며, 각 세포별 microarray 결과를 plot으로 나타내어 전체 데이터의 신호강도 분포를 확인하였다.

정량 PCR 분석(quantitative real-time PCR analysis)

miRNA microarray 결과 중, 세포분화에 따른 miRNA 발현의 차가 있는 miRNA (miR-126, miR-194)를 정량 PCR 분석으로 재확인하였다. miScript reverse transcription kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 miRNA 1µg, R-Tase mix 0.5µL 및 RT buffer 2µL를 혼합한 후, 전체 부피가 10µL가 되도록 DEPC를 처리한 물로 적정하였으며, 37°C에서 60분간 반응시키고 95°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 miScript SYBR Green PCR kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 cDNA 3ng, SYBR Green master mix 10µL, universal primer 1µL 및 각 miRNA primer 1µL를 혼합한 후, 전체 부피가 20µL가 되도록 DEPC를 처리한 물로 적정하였다. Exicycler™ 96(Bioneer co., Daejeon, Korea)을 이용하여 95°C에서 15분간 반응시킨 후, 94°C에서 15초, 55°C에서 30초, 70°C

에서 30초를 45회 반복하여 반응시켰다. 정량 PCR 결과를 qcalculator 1.0 program(Institut of Pharmacology & Toxicology, University of Bonn, Bonn, Germany)을 이용하여 Ct 값에 따른 miRNA양을 정량적으로 계산하여 분석하였다. 정량을 위한 내부 대조군(internal control)으로는 u6를 이용하였으며, PCR 분석에 사용된 각 miRNA primer는 Table 1에 나타내었다.

Vector 제작

miR-194의 세포 내 발현을 위해 pSUPER basic vector (Oligoengine Inc., Seattle, WA, USA)(Fig. 1)를 이용하여 miR-194 염기서열을 포함하는 vector를 제작하였다. miR-194를 클로닝하기 위해, miR-194를 제조할 수 있는 primer (Table 2)를 제작하여 non-template PCR을 수행하였다. PCR 생산물(insert oligo)과 pSUPER basic vector를 제한효소 Bgl II(AGATCT)와 Xho I(GAGCTC)으로 각각 절단한 후, T4 DNA ligase를 이용하여 miR-194 염기서열을 vector에 접합시켰다. 재조합 된 vector를 competent cell(DH-5a)에 transformation 시킨 후, 항생제 ampicillin이 포함된 LB agarplate에 콜로니를 배양하여 플라스미드(vector)를 분리하고 그 염기서열을 확인하였으며, 정확한 miR-194 염기서열을 보유한 재조합 vector를 선별하여 실험에 이용하였다.

Table 1. miRNA forward primer sequences for quantitative real-time PCR analysis

| miRNAs | Primer sequences |
|---------|-----------------------|
| miR-126 | TCGTACCGTGAGTAATAATGC |
| miR-194 | TGTAACAGCAACTCCATGTGG |
| u6 | CGCAAGGATGACACGCAAATT |

Table 2. The full sequences and primer sequences of miR-194 for vector construction

| miRNA Full sequence of miRNA | Primer sequences of miRNA |
|------------------------------|---------------------------|
| | Forward : |
| | AGCAGATCTTGGTTCC |
| TGGTTCCCGCCCCCT | CGCCCCCTGTAACAGC |
| GTAACAGCAACTCC | AACTCCATGTGGAAGT |
| ATGTGGAAGTGCCC | GCCCACTGGTTCC |
| miR-194 | ACTGGTTCCAGTGG |
| | Reverse : |
| GGCTGCTGTTATCTG | GACCTCGAGCTGGCCC |
| GGCGAGGGCCAG | TCGCCCCAGATAACAG |
| | CAGCCCCACTGGAACC |
| | AGTGGGCAC |

Alizaline red-S 염색

miRNA에 의한 MDPC-23 세포주의 석회화 결절효과를 확인하기 위하여 Alizaline red-S 염색을 시행하였다[15]. 세포분화를 유도한 각 실험군의 MDPC-23 세포주를 PBS로 3회 세척한 후, 70% ethyl alcohol로 20분 동안 고정한 다음 0.1% NH4OH가 함유된 1% Alizaline red-S(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 5분간 염색하여 관찰하였다.

실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean ± SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 one-way ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p<0.05의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

MDPC-23 세포주에서 세포분화에 따른 miRNA microarray 분석

세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 MDPC-23 세포주에서 세포분화에 따른 miRNA 발현양상을 microarray 분석으로 확인하였다. 총 1,769개의 miRNA를 비교 분석한 결과, 대조군인 세포분화 0일째의 MDPC-23 세포주와 비교하여 세포분화 5일째의 MDPC-23 세포주에서 각각 11개의 miRNA에서 발현이 3배 이상 증가 또는 감소하였다(Table 3과 4). 그 중 변화량이 5배 이상인 것은 발현이 증가한 miR-21과 miR-663이었고, 발현이 감소한 miR-23b, miR-1244, miR-27b 및 miR-27a이었다(Fig. 2). 세포분화 15일째의 MDPC-23 세포주에서는 분석한 1,769개의 miRNA를 대조군인 세포분화 0일째의 MDPC-23 세포주와 비교하면 313개 miRNA 발현이 3배 이상으로 증가하였으며, 206개 miRNA 발현이 3배 이상 감소하였

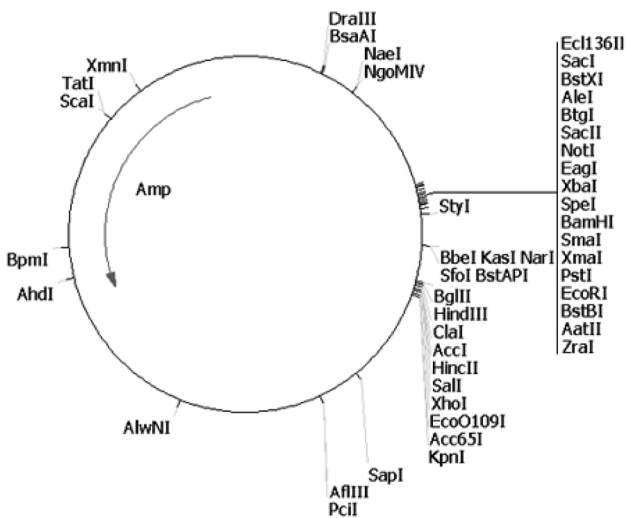


Fig. 1. The map of pSUPER basic vector (Oligoengine Inc., Seattle, WA, USA)

다. 그 중 특이적으로 20배 이상 증가한 miRNA는 miR-663, miR-711 및 miR-29b이었으며, 20배 이상 감소한 miRNA는 miR-23b, miR-93 및 miR-615이었다(Fig. 3).

MDPC-23 세포주에서 정량 PCR에 의한 miRNA 발현 분석

miRNA microarray 결과 중, 세포분화 0일째와 5일째의 MDPC-23 세포주를 비교하였을 때 3배 이상 발현의 차가 있는 miRNA 중 가장 차이가 작은 miRNA(miR-194, miR-126)를 miScript reverse transcription kit를 이용하여 정량 PCR 분석으로 재확인하였다. 정량 PCR 결과, miR-194는 세포분화 0일째의 MDPC-23 세포주에 비해 세

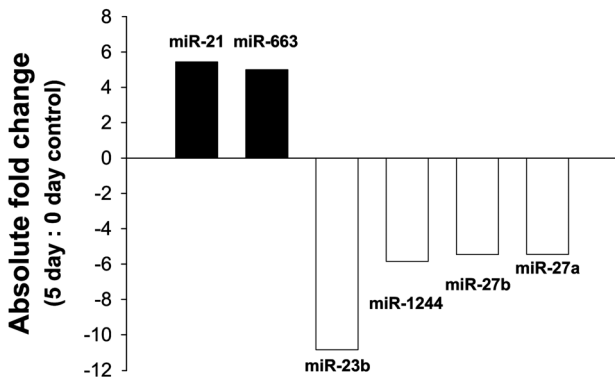


Fig. 2. miRNAs up- or down- regulated in the MDPC-23 cells at 5 day after treatment with differentiation media in comparison to the control MDPC-23 cells at 0 day by miRNA assay analysis. Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than ± 13%.

Table 3. miRNAs up-regulated in the MDPC-23 cells at 5 day after treatment with differentiation media in comparison to the control MDPC-23 cells at 0 day

| miRNAs | Absolute fold change |
|----------|----------------------|
| miR-21 | 5.44 |
| miR-663 | 5.00 |
| miR-26b | 4.13 |
| miR-1308 | 4.08 |
| miR-9 | 3.83 |
| miR-612 | 3.77 |
| miR-218 | 3.57 |
| miR-181c | 3.42 |
| miR-186 | 3.19 |
| miR-10a | 3.08 |
| miR-194 | 3.02 |

Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than ± 13%.

Table 4. miRNAs down-regulated in the MDPC-23 cells at 5 day after treatment with differentiation media in comparison to the control MDPC-23 cells at 0 day

| miRNAs | Absolute fold change |
|------------|----------------------|
| miR-23b | -10.85 |
| miR-1244 | -5.85 |
| miR-27b | -5.46 |
| miR-27a | -5.45 |
| miR-744 | -4.36 |
| miR-125b-1 | -4.18 |
| miR-23a | -4.11 |
| miR-494 | -3.80 |
| miR-222 | -3.45 |
| miR-671-5p | -3.26 |
| miR-126 | -3.06 |

Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than ± 13%.

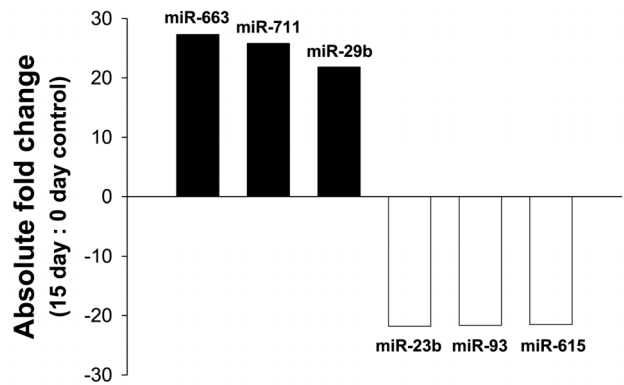


Fig. 3. miRNAs up- or down- regulated in the MDPC-23 cells at 15 day after treatment with differentiation media in comparison to the control MDPC-23 cells at 0 day by miRNA assay analysis. Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than ± 16%.

세포분화 5일째의 MDPC-23 세포주에서 그 발현이 약 6.32배 증가하였고 miR-126은 약 10.39배 감소하였으며(Fig. 4), 정량 PCR에 의한 miRNA 발현분석 결과는 miRNA microarray 분석결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

MDPC-23 세포주에서 석회화 결절형성에 미치는 miR-194의 효과

MDPC-23 세포주 분화과정에서 석회화 결절형성에 미치는 miR-194의 효과를 확인하기 위하여, MDPC-23 세포주 분화과정에서 200ng/ml의 miR-194를 48시간 처리한 후, Alizaline red-S 염색을 시행하였다. 배양 3일째에 서부터 대조군에 비해 miR-194 처리군에서 석회화 결절

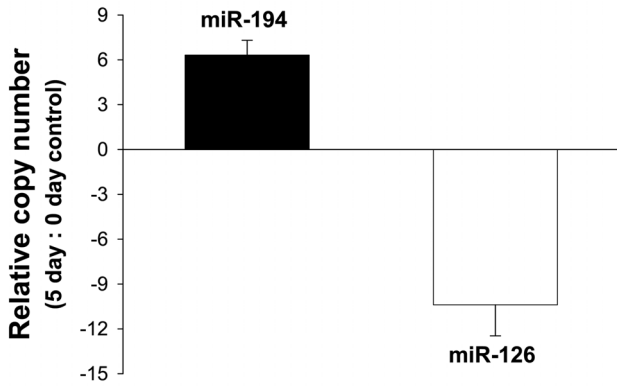


Fig. 4. miRNAs up- or down- regulated in the MDPC-23 cells at 5 day after treatment with differentiation media in comparison to the control MDPC-23 cells at 0 day by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The qRT-PCR was performed as described in “MATERIALS AND METHODS”. The expression level of miRNA was calculated by using qcalculator 1.0 program after internal control u6 normalization. Each relative copy number value represents the mean of three independent experiments. The expression levels of miR-194 and miR-126 were increased and decreased in the control MDPC-23 cells compared to in the 5 days of MDPC-23 cell differentiation, respectively.

정도가 약간 증가하는 경향을 보였으며, 배양 5일째와 배양 7일째로 시간이 경과할수록 대조군에 비해 miR-194 처리군에서 석회화 결절의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 5)

고 찰

후생유전이란 DNA 염기서열 변화 없이 DNA를 둘러싼 여러 요인들의 변화로 유전자가 조절되는 것을 말하고, 후생유전의 구성요소에는 염색질 변형(chromatin modification), DNA 메틸화(DNA methylation) 및 RNA 간섭(RNA interference) 등이 있으며, 이들 세 요소들이 각기 다른 역할도 하지만 서로 밀접하게 관련되어 표적유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다[16,17]. 최근 miRNA는 진핵세포 내에서 다양한 유전자를 조절함으로써 세포분화, 성장 및 증식 등 대부분의 생명현상에 관여하는 것으로 보고되고 있으나[2-6], 상아질모세포를 포함한 치아경조직형성세포에서 miRNA 연구는 매우 부족하다. 따라서 본 연구에서는 상아질모세포로서 MDPC-23 세포주를 이용하여, 이들의 분화과정에서 miRNA들의 발현을 비교·분석하여 상아질모세포 분화 특이 miRNA를 확립하고자 하였다.

세포분화와 석회화가 유도된 MDPC-23 세포주에서 세포분화에 따른 miRNA 발현양상을 비교하기 위한 microarray 분석결과, 세포분화 0일째의 MDPC-23 세포주와

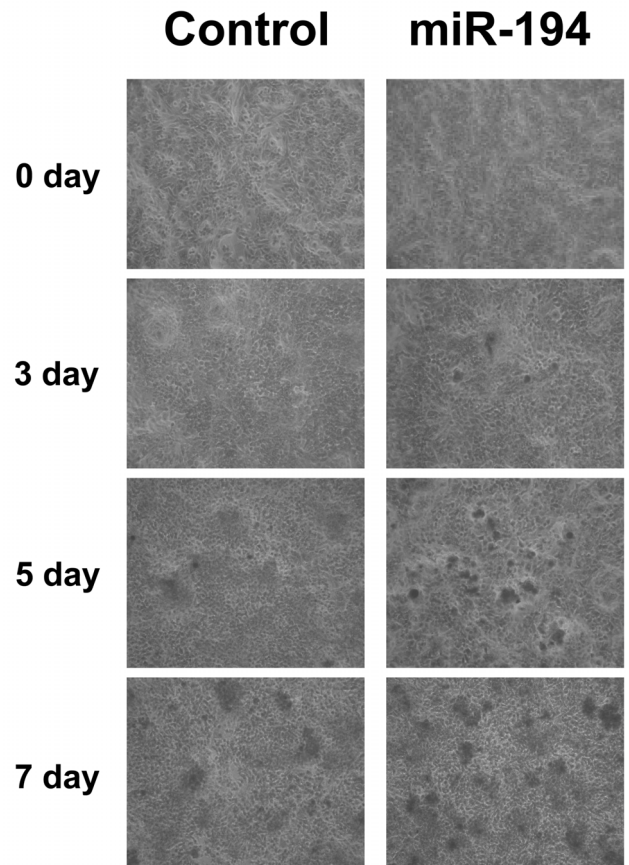


Fig. 5. Mineralized nodule formation in MDPC-23 cells. The mineralized nodule formation induced by the differentiation media and miR-194 was examined after 0, 3, 5 and 7 days of culture. The cells were grown in the presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate for inducing the mineralization and were examined the effect of miR-194 on mineralized nodule formation. The nodules were detected by Alizaline red-S staining. The overexpression of miR-194 accelerated the mineralization as compared with the control culture in the differentiation of MDPC-23 cells.

비교하여 세포분화 5일째에서 5배 이상 크게 증가한 mi RNA는 miR-21과 miR-663이었으며, 5배 이상 감소한 mi RNA는 miR-23b, miR-1244, miR-27b 및 miR-27a이었다. 또한 세포분화 0일째의 MDPC-23 세포주와 비교하여 세포분화 15일째에서 특이적으로 20배 이상 증가한 mi RNA는 miR-663, miR-711 및 miR-29b이었으며, 20배 이상 감소한 miRNA는 miR-23b, miR-93 및 miR-615이었다. 본 연구에서는 miRNA microarray 결과를 정량 PCR 분석으로 재확인하였다. 재확인에 사용한 miRNA는 microarray 결과에서 세포분화 0일과 5일째 비교하여 발현되는 정도가 3배 이상 차이나는 것 중 가장 차이가 작은 miR-194와 miR-126를 이용하였다. 정량 PCR 결과, miR-194는 세포분화 0일째의 MDPC-23 세포주에 비해 세포분화 5일째에서 그 발현이 약 6.32배 증가하였고 miR-

126은 약 10.39배 감소하였다. 이러한 실험 결과는 정량 PCR에 의한 miRNA 발현분석 결과는 miRNA microarray 분석결과와 유사함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구의 miRNA microarray와 정량 PCR 결과는, MDPC-23 세포주 분화과정에서 miRNA들의 발현이 증가한 miRNA와 감소한 miRNA가 상아질모세포 분화에 대한 특이적인 역할을 지닐 수 있음을 시사한다.

본 연구에서 Alizaline red-S 염색분석을 이용하여 MDPC-23 세포주 분화에 미치는 miR-194(세포분화 0일째와 5일째의 MDPC-23 세포주를 비교하였을 때 3배 이상 발현의 차가 있는 miRNA 중 가장 차이가 작은)의 효과를 조사한 결과, 시간이 경과할수록 대조군에 비해 miR-194 처리군에서 세포분화 및 석회화 결절의 증가를 보여주었다. 이러한 결과들은 MDPC-23 세포주 분화과정에서 miR-194가 상아질모세포 분화에 특이적인 효과를 가지고 있다는 것을 시사하며, 또한 상아질 재생의 표적으로서 miR-194를 포함한 miRNA들의 잠재적인 가치를 시사하고 있다.

그러나 본 연구에서 실험에 이용한 세포주 등 표본들의 수에는 한계가 있었으며, 이들 miRNA가 유도하는 상아질모세포 분화 및 석회화에 관한 표적 유전자 분석 등 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다. 본 연구의 대상이 되는 miRNA는 다른 유전자 조절 메커니즘에 비해 최근에 밝혀지고 있지만, 그 작용기전과 표적하는 유전자가 최근 들어 많이 연구되고 그 기능 연구 또한 매우 활발히 진행되고 있다[2-6]. 이러한 miRNA에 의한 유전자 발현조절은 향후 매우 중요한 유전자 조절 방식의 하나로 자리매김할 것으로 여겨지고 있다. 특히 상아질모세포를 비롯한 치아경조직형성 세포들의 분화 특이 miRNA를 확립하여 miRNA 제어에 따른 이들 세포들의 분화와 석회화에 대한 기능적 정보를 규명한다면, 궁극적으로 이 miRNA를 이용한 치아경조직 재생에 대한 새로운 전략도 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로, 상아질모세포로서 MDPC-23 세포주 분화과정에서 다수의 miRNA에서 그 발현이 증가하거나 감소하였으며, miR-194가 상아질모세포 분화에 특이적인 효과를 가지고 있었다. 또한 본 연구의 결과로 이들 miRNA를 이용한 상아질모세포 분화와 석회화 및 상아질 재생에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로

한국연구재단의 기초연구 사업 지원을 받아 수행된 것임 (No. 2010-0020988).

참고문헌

1. Kim VN, Kataoka N, Dreyfuss G. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science*. 2001;293:1832-6.
2. Gomes CC, Gomez RS. MicroRNA and oral cancer: future perspectives. *Oral Oncol*. 2008;44:910-4.
3. Liu X, Chen Z, Yu J, Xia J, Zhou X. MicroRNA profiling and head and neck cancer. *Comp Funct Genomics*. 2009; 837514:1-11.
4. Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y, Deng G, Dahiya R. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer*. 2010;116:5637-49.
5. Li J, Chen Y, Zhao J, Kong F, Zhang Y. miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression. *Cancer Lett*. 2011; 304:52-9.
6. Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. Micro RNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin Cancer Res*. 2011;17:2725-33.
7. Begue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1994;38:405-20.
8. Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure and function. 6th ed., St. Louis, Mosby, 2003, pp 78-103.
9. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res*. 2000;258:33-41.
10. Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(Suppl 1):260-6.
11. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res*. 1998;37:233-49.
12. Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Begue-Kirn C, Wataha JC, Hanks CT, Butler WT. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res*. 1998;37:251-61.
13. Shibuya N, Nemoto E, Kanaya S, Kunii R, Shimauchi H. Retinoic acid is a potential negative regulator for differentiation of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2005;40:432-40.
14. Kim HR, Park E, Cho KH, Kim DK. MicroRNA analysis in normal human oral keratinocytes and YD-38 human oral

- cancer cells. *Int J Oral Biol.* 2011;36:179-85.
15. Park JH, Kim DK, Park JT, Kim SY, Yu SK, Cho KH, Kim HJ. Effects of chitosan on the differentiation of MDPC-23 cells. *Int J Oral Biol.* 2010;35:91-7.
 16. Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet.* 2006;15:R95-101.
 17. Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis.* 2006;27:1121-5.