

## 흰쥐 상아질모세포 분화과정에서 OD314의 역할

박주철, 김익환, 김흥중, 정문진, 오현주, 정제오, 손호현<sup>1</sup>

조선대학교 치과대학 구강조직학교실 및 BK21,

<sup>1</sup>서울대학교 치과대학 치과보존학교실

**간추림** : 상아질모세포는 상아질을 형성하고 유지하는 세포이다. 상아질모세포-특이 유전자로 널리 알려진 DSPP는 상아질의 석회화 과정에는 중요한 역할을 하나, 현재까지 DSPP 이외의 인자를 동정하고 이를 통하여 상아질모세포의 분화와 상아질의 석회화 과정을 분자생물학적으로 연구한 결과들은 거의 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 최근에 상아질의 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 OD314 유전자의 발현을 분석하고, OD314 유전자의 과발현과 발현억제가 상아질모세포의 분화에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

MDPC-23 세포의 분화과정에서 OD314 mRNA는 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 21일까지 그 발현이 증가하였고, 배양 28일에도 강한 발현이 유지되었다. 면역세포형광 염색에서 OD314 단백질은 세포의 핵에서는 약하게 발현되었으나, 세포질에서 강하게 발현되었으며 특히 핵에 인접한 세포질에서 더욱 강한 발현을 보였다. 상아질모세포의 석회화 관련 유전자인 DSPP는 OD314의 발현을 억제하였을 때 발현이 현저히 증대 되었으며, ON은 OD314를 과발현 시켰을 때 발현이 감소하였다.

이상의 결과를 종합하면 OD314는 상아질모세포의 분화와 상아질의 형성 및 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 새로운 인자로 사료된다.

**찾아보기 낱말** : 상아질모세포, OD314, 분화, MDPC-23

### 서 론

상아질모세포는 상아질을 형성하고 유지하는 세포이다. 상아질모세포는 신경능선(neural crest) 세포 유래의 외배엽성 간엽세포(ectomesenchymal cell)에서 기원하며, 상아질의 유기기질을 합성, 분비하며 석회화에도 관여한다(Lesot 2000). 상아질의 유기기질은 교원질성과 비교원질성 단백질로 구분된다. Dentin sialophosphoprotein (DSPP)은 비교원질성 단백질에 속하는 대표적인 상아질-특이 단백질로 하나의 유전자로부터 dentin sialoprotein (DSP)과 den-

tin phosphoprotein (DPP)의 두 가지 단백질을 합성하는 것으로 알려져 있다(Ritchie 등 1994, D'souza 등 1997, MacDougall 등 1997, Butler 1998).

최근에 Nakashima 등(2002)이 골격근 전구세포인 C2C12 세포주에 BMP (bone morphogenic protein)-2를 투여한 다음 분화 유도된 뼈모세포 유전자를 subtraction법으로 비교하여 뼈모세포-특이 단백질인 osterix를 동정하였다. 그들은 osterix가 뼈모세포를 다른 세포와 구별 할 수 있는 뼈모세포-특이 단백질로서의 역할 뿐 아니라, Runx2/CBFA1과 더불어 뼈모세포의 분화와 막내골화 그리고 연골성 골화를 조절하는 인자로서 기능을 한다고 보고하였다. 이 연구 결과는 미분화 간엽세포에서 뼈모세포나 상아질모세포 등의 특정 형태의 세포가 분화할 때 각 각의 세포의 분화를 조절하는 분화유도인자가

\*본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-10141-0)지원으로 수행되었음.

교신저자 : 손호현 (서울대학교 치과대학 치과보존학교실)  
전자우편 : hhson@snu.ac.kr

세포-특이 유전자와 깊은 관련을 갖는 다는 것을 의미한다. 상아질모세포-특이 인자의 기능과 관련하여, Sreenath 등(2003)은 현재까지 대표적인 상아질모세포-특이 유전자로 널리 알려진 DSPP는 상아질의 석회화 과정에는 중요한 역할을 하나, 상아질모세포의 분화를 조절하거나 유도하는 인자로는 볼 수 없다고 하였다.

골조직과 상아질의 유사한 특성을 고려하면 상아질모세포에도 DSPP 이외에 골 조직의 osterix와 같은 역할을 하는 현재까지 알려지지 않은 또 다른 상아질모세포-관련 유전자나 특이 유전자 연구가 존재한다고 가정 할 수 있다. 이들이 상아질모세포에 특이하게 존재해서 상아질모세포의 분화과정이나 상아질의 형성과정을 조절할 수 있을 것이다. 최근에 상아질모세포-관련 혹은 특이 유전자를 새롭게 찾아내고 이를 연구하여 상아질모세포 분화과정과 석회화 과정을 분자생물학적으로 이해하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다(Butler 1987, Buchaills 등 2000, Gaikwad 등 2001).

최근에 Dey 등(2001)이 상아질모세포의 분화와 상아질 형성과정에 관여하는 기전을 밝힐 목적으로, 머리뼈의 뼈모세포(cavariial osteoblast)와 치유두세포(dental papilla cell)에서는 발현되지 않고 상아질모세포/치수세포(odontoblast/pulpal cell)에서 특이하게 발현되는 상아질모세포-관련 인자 OD314를 subtraction법으로 동정하고, northern 분석을 통하여 OD314 mRNA는 뼈, 뇌, 심장, 신장, 간, 폐, 골격근에서는 발현되지 않으며 상아질모세포에서 선택적으로 발현된다고 하여, OD314의 상아질모세포 분화과정과 상아질 형성과정에서의 역할을 암시하였다. 또한, Kim 등(2004a)은 OD314 mRNA와 단백질이 다른 세포들에 비하여 상아질모세포에서 선택적으로 발현된다고 하였다. Kim 등(2004b)도 상아질모세포 전구세포주인 MDPC-23 세포주의 배양 실험에서, OD314가 치수세포들이 상아질모세포로 분화하는 초기 과정에서부터 발현되어 일정기간 유지되다가 석회화 과정에서 더욱 증가된 발현을 보인다고 보고하여 OD314의 상아질모세포 분화과정과 상아질의 석회화 과정에서의 역할을 시사하였다.

이에 본 연구에서는 최근에 새롭게 알려진 OD314

유전자의 조직과 세포내 발현을 확인하고, 상아질모세포 전구세포주인 MDPC-23 세포의 분화과정에서 OD314와 DSPP 등의 유전자 발현을 분석하여 상아질모세포 분화과정에서 OD314의 역할을 이해하고자 하였다. 또한, OD314 유전자를 과발현(over-expression)시킬 수 있는 CMV-OD314 construct와 OD314 유전자의 발현을 억제(inactivation)할 수 있는 U6-OD314 siRNA construct를 제작하고, 이를 MDPC-23 세포주에 적용하여 상아질모세포 분화과정에서 OD314 유전자의 기능을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배양 상아질모세포 분화 과정에서 OD314 mRNA의 발현

#### 1) 세포 배양

치유두세포(dental papilla cell) 유래의 MDPC-23 세포주를 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제(Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL, Gentamycin 50 µg/mL 및 fungizone 2.5 µg/mL)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, USA)에 ascorbic acid (50 µL/mL)와 β-glycerophosphate (10 mM)를 첨가하여 배양하였다. 배양 0일, 4일, 7일, 14일, 28일 후 Trizol 용액 (Gibco BRL, Rockville, USA)을 이용하여 각 각의 세포에서 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA의 양은 spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA)로 계산한 다음 20 µg 씩 분주하여 -70°C에 보관하였다.

#### 2) Northern 분석

세포 배양 0일, 4일, 7일, 14일, 28일 후에 추출한 20 µg의 총 RNA를 각각 0.8% agarose gel에 전기영동하고 nylon membrane (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 blotting하였다. 0.462 kb의 OD314 ORF 유전자 단편(Kim 등 2004a), 0.543 kb의 dentin sialophosphoprotein (DSPP) 유전자단편(Steel-Perkins 등 2003), 1.16 kb의 osteonectin (ON) 유전자 단편과 1.6 kb의

rat glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase (GA-PDH) 유전자 단편들(Dey 등 2001)을 이용하여 세포 배양 0일, 4일, 7일, 14일, 28일 후의 총 RNA에 실험 1-2)와 동일한 방법으로 northern 분석을 시행하였다.

## 2. OD314 단백질의 세포내 분포

### 1) 세포 배양

MDPC-23 세포주를 실험 방법 2-1)과 동일한 방법으로 coverslip에서 배양하였다.

### 2) 항체 제작

Kim 등(2004a)의 방법으로 OD314 단백질 영역에서 주분 제작된 항체 CST15와 CPE14를 실험에 이용하였다.

### 3) 세포 면역형광 염색

MDPC-23 세포가 coverslip에서 70% confluence 된 것을 확인한 후 배양액을 제거하고 Phosphate Buffered Saline (PBS)으로 2회 세척한 다음 4% paraformaldehyde (PFA)로 실온에서 15분간 고정하고 다시 PBS로 5분간 3회 세척 하였다. 0.15% Tronton X-100/PBS로 10분간 처리한 후 1% BSA (Bovine Serum Albumin)/PBS 용액을 사용하여 실온에서 10분간 Blocking 하였다. 1% BSA/PBS 용액을 사용하여 1:150의 비율로 희석한 OD314 항혈청(1차 항체)으로 실온에서 1시간 30분 동안 처리 하였다. PBS로 10분간 3회 세척 한 후 PBS로 1:80 비율로 희석한 Fluorescein anti-Rabbit IgG항체(2차 항체, Vector Lab, Burlingame, CA, USA)로 실온에서 1시간 30분 동안 처리 하였다. PBS로 10분간 3회 세척한 후 VECTASHIELD DAPI (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)로 봉입 하여 Axioscope 멀티형광 현미경 (Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

## 3. OD314의 과발현과 발현 억제가 상아질모세포 분화과정에 미치는 영향

### 1) OD314 과발현 construct의 제작

OD314의 ORF를 포함하는 cDNA를 진핵 세포

발현 vector인 pcDNA3의 EcoRI 절단 부위에 정상 단백질 합성 방향으로 위치시킨 후 potent cytomegalovirus promoter (pCMV)를 부착시켜 construct 제작 하였다.

### 2) OD314 발현 억제 construct의 제작

Kim 등(2004b)의 방법으로 제작한 OD314 siRNA construct를 본 실험에 이용하였다.

### 3) MDPC-23 세포 배양 및 transfection

MDPC-23 cell을  $3.0 \times 10^7$ 개씩 60 mm 배양 접시 (Nunc, USA)에 넣고 10% FBS (Gibco BRL, Rockville, USA)이 함유된 DMEM (Gibco BRL, Rockville, USA)에 ascorbic acid (50  $\mu$ L/mL)와  $\beta$ -glycerophosphate (10 mM)를 첨가하여 하룻밤동안 배양 시켰다. 다음날 세포가 배양접시의 50~60%의 면적 까지 증식한 것을 확인한 후 Lipofectamine reagent (Gibco BRL, Rockville, USA)와 plus reagent (Gibco BRL, Rockville, USA)에 각각 U6-OD314 siRNA 플라스미드와 CMV-OD314 플라스미드를 혼합한 다음 OPTI-MEM (Gibco BRL, Rockville, USA)을 넣고 배양기에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 5~7시간 배양시켰다. 배양 후 10% FBS와 ascorbic acid 그리고  $\beta$ -glycerophosphate가 포함된 DMEM 배양액을 첨가 한 다음 배양기에서 하루 더 배양한 후 RNA를 추출하였다.

### 4) Northern 분석

정상세포 군, vector만 transfection한 군, OD314 과발현 군 및 OD314 발현 억제 군에서 추출한 RNA blot과 실험 방법 2-2)의 OD314, DSPP, ON 및 GAPDH 유전자 probe를 이용하여 northern 분석을 시행하였다.

## 4. 흰쥐 치아 발생과정에서 OD314 단백질의 발현

### 1) 조직 표본제작

생후 7일, 21일, 40일의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 각각 5마리씩 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정 시킨 후 턱뼈머리를 포함한 아래

턱을 적출한 다음 4°C의 4% paraformaldehyde 용액에서 16시간 재 고정하였다. PBS 용액으로 2시간 세척하고, 10% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, pH 7.4) 용액에서 2주에서 4주간 탈회하고, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV ethanol로 각각 12시간씩 탈수하였다. Chloroform 용액에서 4회 2시간씩 처리한 후 통법에 따라 paraffin 포매 하고 5 µm 두께로 앞니부에서부터 순차적으로 치아의 장축에 직각되게 박절한 후 ethoxysilran-coated 슬라이드에 붙여 4°C 상태에서 보관 후 실험에 이용하였다.

## 2) 조직 면역형광 염색

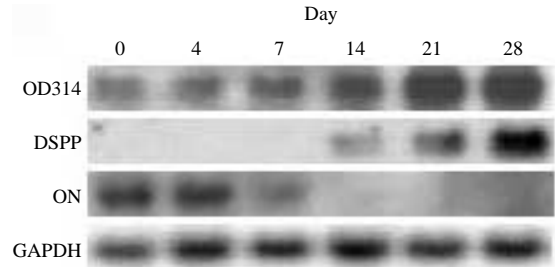
절편을 탈 파라핀 처리 후 OD314 일차항체를 이용하여 실험 3-3)의 세포 면역형광 염색과 동일한 방법으로 염색한 후 Axioscope 멀티형광 현미경 (Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

# 결 과

## 1. 배양 상아질모세포 분화 과정에서 OD314 mRNA의 발현

MDPC-23 cell은 배양초기에는 섬유모세포와 유사한 다각형모양으로 배양접시에 단층으로 잘 부착되어 있다가, 배양 7일경부터 국소적인 세포증식이 관찰되었다. 배양 14일에서부터는 세포들이 여러 층으로 구성된 세포 덩어리를 형성하였고, 배양 21일에는 세포 덩어리가 결절과 유사한 형태로 바뀌어서 28일까지 유지되었다.

MDPC-23 cell에 ascorbic acid와 β-glycerophosphate 첨가하여 석회화 결절의 형성을 유도한 28일의 배양 과정에서 OD314 mRNA는 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 21일까지 그 발현이 증가하였고, 배양 28일에도 강한 발현이 유지되었다. DSPP mRNA는 세포의 증식이 관찰되는 배양 14일에서부터 발현되어 배양 28일까지 그 발현이 증가하였다. 그러나 ON mRNA는 배양 시작 후 4일까지 발현이 유지되다가 7일에는 그 발현이 현저히 감소



**Fig. 1.** Northern blot analysis of mRNAs for OD314 and matrix components in MDPC-23 cells cultured for up to 28 days (DSPP, dentin sialophosphoprotein; ON, osteonectin; GAPDH, glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase).

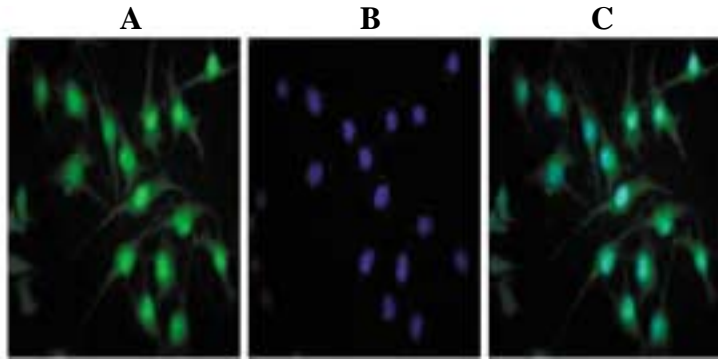
하였고, 배양 14일부터는 발현을 관찰 할 수 없었다 (Fig. 1).

## 2. OD314 단백질의 세포내 분포

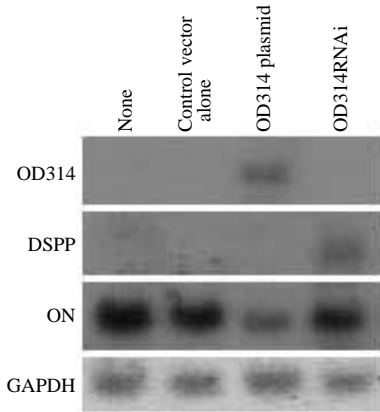
MDPC-23 세포에 OD314항체를 반응시킨 후 형광염료인 FITC로 증폭시킨 결과 OD314 단백질은 핵에는 약하게 발현되었으나, 세포질에서 강하게 발현되었고, 특히 핵 근처 세포질에서는 발현이 더욱 현저하였다 (Fig. 2A). 또한, 세포질 내에서 OD314 발현은 핵 주변부에서 세포질쪽으로 분산되는 양상을 보였다. OD314가 MDPC-23 세포의 핵 내에 분포하는지를 확인하고자 핵에 특이적으로 반응하여 푸른색으로 나타나는 형광염료인 DAPI를 사용하였다. 그 결과, 핵에서의 분포가 상대적으로 핵 주위 세포질에 비해 약하게 나타났다 (Fig. 2B, C).

## 3. OD314의 과발현과 발현 억제가 상아질모세포 분화과정에 미치는 영향

CMV-314를 transfection하여 OD314의 과발현을 유도한 경우에는 OD314의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, U6-314 siRNA를 transfection하여 OD314를 발현 억제 시킨 경우에는 OD314는 관찰 되지 않았다. 상아질모세포의 석회화 관련 유전자인 DSPP는 OD314의 발현을 억제한 경우에 그 발현이 현저히 증대되었다 (Fig. 3). ON은 정상군과 control vector transfection한 군 그리고 U6-314 siRNA를 이용 발현 억제한 군에서는 동일한 양상으로 강하게 발현



**Fig. 2.** Immunofluorescent localization of OD314 in MDPC-23 cells. MDPC-23 cells grown on coverslips were fixed with paraformaldehyde and incubated with polyclonal anti-OD314 antibody (green). After incubation the cells were mounted in DAPI (blue) mounting medium. *Panel A*, localization of OD314; *panel B*, nuclear staining with DAPI; *panel C*, the double labelling of A and B.

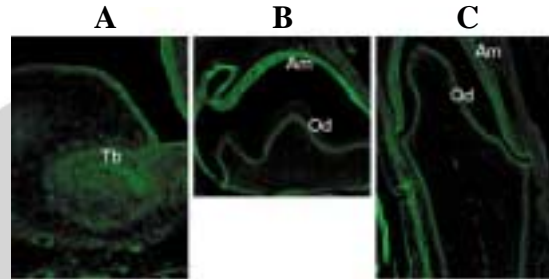


**Fig. 3.** Northern blot analysis of OD314, DSPP, and ON mRNA expression in MDPC-23 cells after over-expression with CMV-OD314 plasmid and after inactivation of OD314 with U6-OD314 siRNA (DSPP, dentin sialophosphoprotein; ON, osteonectin; GAPDH, glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase).

되었으나, CMV-314를 이용하여 OD314를 과발현 시킨 경우에는 ON의 발현이 감소하였다.

#### 4. 흰쥐 치아 발생과정에서 OD314 단백질의 발현

OD314가 상아질모세포 이외의 치아조직과 세포



**Fig. 4.** Immunofluorescent localization of OD314 in developing rat teeth. Tissue sections were fixed with paraformaldehyde and incubated with polyclonal anti-OD314 antibody. *Panel A*, tooth bud from 18 days-old rat embryo; *panel B*, developing tooth from 7 days-old postnatal rat; *panel C*, developing tooth from 21 days-old postnatal rat (Tb, tooth bud; Am, ameloblast; Od, odontoblast).

에서 발현되는 양상을 관찰하기 위하여 발생 중인 치아 조직을 OD314 항체로 면역조직형광 염색을 시행하였다. 발생 18일의 모자상기(cap stage) 치배에서 OD314의 발현은 치아기(dental organ)와 치유두(dental papilla) 그리고 치낭(dental follicle)에서 모두 잘 관찰 되지 않았다(Fig. 4A). 아래턱 첫째 어금니의 치관이 형성되는 생후 7일의 발육중인 치아에서 OD314는 상아질모세포에서 그 발현이 확인되었으며, 사기질모세포에서도 강한 발현을 보였다

(Fig. 4B). 위턱 앞니의 치근 형성이 거의 완료된 시점인 생후 21일의 발육중인 치아에서도 OD314는 상아질모세포 뿐만 아니라 사기질모세포에서도 발현되었다(Fig. 4C).

## 고 찰

상아질모세포의 분화과정은 다양한 세포기질분자, 신호전달물질, 성장인자 그리고 여러 수용체들이 관여하는 고도로 조직화된 과정으로 알려져 있다 (Tziafas와 Kolokuris 1990, Ritchie 등 1998, Telles와 Hank 2003). 상아질모세포의 분화와 관련한 인자들로 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Tziafas와 Papadimitriou 1998), dentin matrix protein 1 (DMP1) (Gronthos 등 2000, Narayanan 등 2001), growth and differentiation factor 11 (Gdf11) (Butler 등 1992), connective tissue growth factor (CTGF) (Shimo 등 2002) 그리고 그 외의 관련 인자 등 (About 등 2002)이 현재까지 알려져 있으나, 이들은 뼈모세포를 포함한 경조직의 형성에 전반적으로 관여하는 인자들로 상아질모세포의 분화에 선택적으로 관여하는 인자는 아닌 것으로 간주되고 있다. 또한, 최근에 상아질모세포-특이 유전자로 널리 알려진 DSPP 유전자가 소실되면 상아질의 석회화 과정에서 석회소구 (calcospherite)의 융합 (coalescence)이 이루어지지 않거나, 치수실 (pulp chamber)이 커지고, 풋상아질 (pre-dentin)의 두께가 넓어지며, 저석회화 (hypomineralization) 및 치수 노출이 일어날 수 있다고 하였으나, 이 과정에서도 상아질모세포의 분화와 성숙과정은 정상적으로 진행된다고 하여 (Sreenath 등 2003) DSPP가 상아질모세포의 분화를 직접 조절하는 인자는 아닌 것으로 알려졌다. 이와 같은 다양한 연구에도 불구하고 상아질모세포의 분화과정이나 상아질의 형성과정과 관련한 분자생물학적 기전에 대하여 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 실험에서 사용한 MDPC-23 세포주는 Hank와 Butler (1998)와 Hank 등 (1998)이 CD-1 흰쥐 어금니의 치유두를 이용하여 만든 세포주로, Sun 등 (1998)이 일정한 조건에서 이세포를 배양하면 세포들이 상아질

모세포의 특성을 나타낸다는 것을 RT-PCR과 northern 분석을 통하여 확인한 세포주이다.

본 실험에서 MDPC-23 세포주를 About 등 (2000)의 실험방법에 따라 석회화 결절의 형성을 유도한 후 OD314, DSPP, ON mRNA의 발현을 분석한 northern 분석한 결과, 배양 14일부터 DSPP가 발현된 것은 치유두세포주인 MDPC-23 세포가 배양 14일이 되어서야 비로소 상아질모세포의 특성을 나타낸다는 것을 의미한다. 또한, OD314 mRNA가 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 21일까지 그 발현이 증가하였고, 배양 28일에도 강한 발현이 유지된 것은 OD314는 상아질모세포의 분화 과정과 상아질의 석회화 과정에 연관된다는 것을 암시한다. 이 결과는 Kim 등 (2004b)이 사람 치수세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한 28일의 배양 과정에서 OD314 단백질은 17kDa의 크기로 배양 시작부터 치수세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일, 14일 까지 유지되며, 석회화 결절이 형성되는 21일과 28일에는 발현이 더욱 증대된다고 한 연구 결과와도 일치한다. 또한, ON mRNA는 배양 시작 후 4일까지 발현이 유지되다가 7일에는 그 발현이 현저히 감소하였는데, 이는 ON이 상아질모세포의 초기 분화과정이나 상아질이 석회화되기 전 단계인 풋상아질에서 발현된다고 한 Papagerakis 등 (2002)의 연구와 일치한다.

본 연구에서 OD314 단백질은 세포의 핵에서는 약하게 발현되었으나 세포질 특히 핵 근처의 세포질에서는 강하게 발현되었다. 이는 세포질 내에서의 OD314 발현이 핵막 근처와 소포체 그리고 골지체가 위치하는 부분으로 추정되는 부위에서 발현된다는 것을 의미하는 것으로, OD314가 상아질모세포의 단백질 또는 효소합성과정이나 단백질동 등에 연관됨을 시사한다. 이를 보다 확실히 규명하기 위해서는 앞으로 OD314의 분포를 immuno-gold로 표지하여 전자현미경으로 확인하는 보완실험이 필요할 것이다.

RNAi (RNA interference)는 특정 유전자의 발현을 억제함으로써 나타나는 효과를 분석하여 역으로 그 기능을 추정하는 연구 방법으로, siRNA (small interfering RNA)를 이용하여 서열 특이적으로 mRNA의

분해를 유도함으로써 단백질 합성을 차단하고 그 결과 유전자의 발현을 간섭작용을 하는 최신 기법이다(Sui 등 2002). CMV promoter는 특정 유전자를 과발현 시키는데 널리 이용되고 있는 체계이다. 본 실험에서 OD314의 상아질모세포 분화과정에서의 역할을 규명하기 위하여 MDPC-23 세포에 U6-314 siRNA construct와 CMV-314 construct를 이용하여 OD314의 과발현과 발현 억제에 유도하였다. OD314의 과발현을 유도하였을 때 OD314 mRNA의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, OD314를 발현 억제 시킨 경우에는 OD314 mRNA의 발현이 관찰 되지 않았다. 이는 MDPC-23 세포에 대하여 OD314의 과발현과 발현억제가 정상적으로 이루어지고 있음을 나타낸다. 특이하게도 대표적인 상아질모세포-특이 석회화 관련 유전자인 DSPP가 OD314의 발현을 억제 한 경우에 그 발현이 현저히 증대된 결과를 보였다. 이 결과는 본 실험의 MDPC-23 세포가 분화하여 석회화가 진행되는 과정에서, OD314 발현이 증가할 때 DSPP의 발현도 같은 양상으로 증진된다고 한 northern 분석 실험 소견과 일치하지 않는 결과이다. 이는 OD314가 DSPP의 발현을 직접 조절하지 않고 세포내의 존재 양에 따라 상호 길항적으로 작용하기 때문에 나타나는 결과로 해석할 수도 있으며, 일반적으로 세포 밖에서 투여된 인자가 세포에 미치는 영향이 농도에 따라 서로 상반된 결과를 나타낸 결과들에도 주목 할 필요가 있다(Tziafas와 Papadimitriou 1998). 예를 들어 Viswanathan 등 (2003)은 저농도의 amelogenin은 시멘트질모세포(cementoblast)의 분화와 석회화를 증진시키지만 고농도의 amelogenin은 시멘트질모세포의 분화와 석회화를 저하시킨다는 연구 결과를 보고한 바 있다. 따라서 앞으로 세포내에 주입하는 유전자의 양을 세분화하여 평가하는 OD314의 과발현과 발현억제 실험도 추가로 필요하다고 할 수 있다.

본 실험의 면역조직형광 염색에서 OD314는 상아질모세포에서도 그 발현이 확인 되었으나, 사기질모세포에서도 강한 발현이 관찰되었다. 이는 Dey 등(2001)이 OD314를 동정하는 과정에서 사기질모세포-특이 유전자인 amelogenin이 상아질모세포-특이 유전자 군에 포함되어 있었던 것으로 보아,

subtraction을 위하여 상아질모세포/치수세포군 조직을 분리할 때 사기질모세포가 일부 포함되어 있었던 것으로 생각된다. 그 이후의 실험에서는 사기질모세포가 존재하지 않는 맹출 후의 치아들과 치수세포나 상아질모세포 등을 이용하여 OD314의 발현을 연구해왔기 때문에 OD314의 사기질모세포에서의 발현을 관찰하지 못한 것으로 보인다. 또한, Qin 등(2002)이 최근까지 상아질모세포-특이 인자로 간주되어 상아질모세포를 구별하는 데에도 널리 이용되고 있는 DSPP가 상아질모세포-특이 단백질이 아니며 골막에서도 존재한다고 한 연구 결과에도 주목할 필요가 있다. 그러나 OD314의 사기질모세포에서의 발현은 OD314가 상아질모세포 뿐만 아니라 사기질모세포에서도 역할을 한다는 것을 암시하는 결과이기 때문에, 사기질모세포 세포주(Nakata 등 2003)를 이용하여 OD314의 기능을 확인하는 보완 연구도 필요할 것이다.

결과를 종합해 보면, OD314는 상아질모세포의 분화와 상아질의 형성과정에 관여하는 새로운 인자로 생각 할 수 있으나, OD314가 상아질모세포 뿐만 아니라 사기질모세포에서도 발현되는 것이 관찰 되었으므로, OD314 유전자의 치아 형성과 관련한 역할을 규명하는 광범위한 향후 보완 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- About I, Bottero MJ, Denato PD, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA : Human dentin production *in vitro*. *Exp Cell Res* 258: 33-41, 2000.
- About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC : Influence of resinous monomers on the differentiation *in vitro* of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mat Res* 63: 418-423, 2002.
- Buchails R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F : A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells : identification of novel gene expressed in tooth forming cells. *Matrix Biol* 19: 421-430, 2000.
- Butler WT : Dentin-specific protien. *Methods in Enzymol* 145: 290-303, 1987.
- Butler WT : Dentin matrix protein. *Eur J Oral Sci* 10691:

- 204–210, 1998.
- Butler WT, Bhowan M, Brunn JC, D'souza RN, Farach-carson MC, Hartha RP, Schrohenloher RE, Seyer JM, Somerman MJ, Foster RA, Tomana M, Djik SV : Isolation, characterization immunolocalization of a 53-KDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 12: 343–351, 1992
- Dey R, Son HH, Cho MI : Isolation and partial sequencing of potentially odontoblast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization. *Arch Oral Biol* 46: 249–260, 2001.
- D'souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, Macdougall M : Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12: 2040–2049, 1997.
- Gaikwad GS, Hoffman M, Cavender A, Bronskers AL, D'Souza RN : Molecular insights into the lineage-specific determination on odontoblasts: the role of CBFA1. *Adv Dent Res* 15: 19–24, 2001.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim P, Robey PG, Shi S : Postnatal human dental pulp stem cell (DPSCs) in vitro and in vivo. *Cell Biol* 97: 13625–13630, 2000.
- Hanks CT, Butler WT : Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res* 37: 251–261, 1998.
- Hanks CT, Fang DN, Sun ZL, Edwards CA, Butler WT : Dentin-specific protein in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci* 106: 260–266, 1998.
- 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* 37: 233–249, 1998.
- Kim DH, Kim HJ, Jeong MJ, Son HH, Park JC : Expression and functional characterization of odontoblast-derived gene: OD314. *J Kor Conservative Dent* 29: 339–408, 2004. (in Korean)
- Kim HJ, Jeong MJ, Son HH, Park JC : Inactivation of the OD314 gene by RNA interference in preodontoblast cell lines. *Kor J Phys Anthropol* 17: 121–129, 2004. (in Korean)
- Lesot H : Odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *J Dent Res* 79: 1640–1644, 2000.
- MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT : Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem* 272: 835–842, 1997.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Crombrughe B : The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17–29, 2002.
- Nakata A, Kameda T, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, Sugiyama T : Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Comm* 308: 834–839, 2003.
- Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A : Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci* 98: 4516–4521, 2001.
- Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M : Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 30: 377–385, 2002.
- Qin C, Brunn JC, Cadenna E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT : The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 81: 392–394, 2002.
- Ritchie HH, Hou H, Veis A, Butler WT : Cloning and sequence determination of rat dentin sialoprotein, a novel dentin protein. *J Biol Chem* 269: 3698–3702, 1994.
- Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH : Six decades of dentinogenesis research: historical and prospective views on phosphoryn and dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci* 106: 211–220, 1998.
- Shimo T, Wu C, Billings PC, Piddington R, Rosenbloom J, Pacifici M, Koyama E : Expression, gene regulation, and roles of Fisp 12/CTGF in developing tooth germs. *Dev Dyn* 224: 267–278, 2002.
- Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB : Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem* 278: 24874–24880, 2003.
- Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, Zeichner-David M, Kim HJ, Cho MI, Gronostajski RM : Essential Role for

- NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Mol Cell Biol* 23: 1075-1084, 2003.
- Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y : A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 99: 5515-5520, 2002.
- Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Begue-kirn C, Wataha JC : Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res* 37: 251-261, 1998.
- Telles PD, Hanks CT, Machado MA, Nor JE : Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res* 82: 446-470, 2003.
- Tziafas D, Kolokuris I : Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *J Dent Res* 69: 75-81, 1990.
- Tziafas D, Papadimitriou S : Role of exogenous TGF- $\beta$  in induction of reparative dentinogenesis *in vivo*. *Eur J Oral Sci* 106: 192-196, 1998.
- Viswannathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, Snead ML, Somerman MJ : Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* 74: 1423-1431, 2003.

K C I

**Abstract**

## **Role of OD314 During Odontoblast Differentiation**

**Joo-Cheol Park, Ik-Hwan Kim, Heung-Joong Kim, Moon-Jin Jeong,  
Hyun-Ju Oh, Je-O Jeong, Ho-Hyun Son<sup>1</sup>**

*Department of Oral Histology and BK21, School of Dentistry, Chosun University*

*<sup>1</sup>Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University*

Odontoblasts are responsible for the formation and maintenance of dentin which is a mineralized part in dentin-pulp complex of tooth. OD314 was obtained by subtractive hybridization between odontoblasts and osteoblast/dental papilla cells, and differentially expressed in the odontoblasts but not in osteoblasts and dental papilla cells.

In this study, to better understand the biological function of new odontoblast-enriched gene, OD314, we examined expression of OD314 in cultured MDPC-23 cells and intracellular localization of OD314 protein. We also evaluate the effect of OD314 over-expression and inactivation on the cells by northern analysis.

When MDPC-23 cells are cultured in the differentiation and mineralization medium for 28 days, OD314 mRNA expression was gradually increased from the beginning to day 21 and remained relatively high on day 28. Immunofluorescent staining of cultured MDPC-23 revealed localization of OD314 on the cytoplasm, especially near the nuclear membrane. However, a small amount of fluorescence was also observed in the nucleus. Inactivation of OD314 by RNA interference up-regulated the expression of DSPP, whereas over-expression of OD314 by CMV-OD314 plasmid down-regulated the expression of ON.

These results suggest that OD314, a odontoblast-enriched gene, may play important roles in the odontoblast differentiation and dentin mineralization.

**Key words :** Odontoblast, OD314, Differentiation, MDPC-23