

Melatonin이 MDPC-23 세포의 분화에 미치는 영향

박주철, 신인철, 이동설, 윤성호, 양재호, 김상봉, 김흥중
조선대학교 치과대학 구강생물학연구소 및 2단계 BK21

간추림 : Melatonin은 솔방울샘 (pineal gland)에서 분비되는 주요 호르몬으로 신체의 여러 생리학적 및 병태생리학적 조절에 관여한다. 최근의 연구들에 따르면 melatonin은 뼈모세포 분화와 바탕질의 석회화를 촉진시켜 골성장 조절에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.

본 연구에서는 상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포를 이용하여 melatonin이 상아질모세포 분화를 촉진시키는 지를 확인하였다. MDPC-23 세포에 분화 배양액과 melatonin을 첨가하여 분화를 유도시킨 후, RT-PCR을 이용하여 dentin sialophosphoprotein (DSPP), osteocalcin (OC), alkaline phosphatase (ALP)와 nuclear factor I-C (NFI-C)의 발현 변화를 분석하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

석회화 결절의 형성은 melatonin의 농도가 증가할수록 촉진되었으며, 특히 분화 15일째에 대조군에 비해 석회화 결절의 형성이 강하게 관찰되었다. DSPP와 OC의 발현은 melatonin의 농도증가에 따라 증가된 반면에, ALP의 발현은 melatonin의 농도에 따라 변화가 없었다. NFI-C의 발현은 melatonin의 농도증가에 따라 배양 초기에 대조군에 비해 크게 감소하였다.

위의 결과들을 종합하면 melatonin은 상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포의 분화와 석회화를 촉진시키며, 상아질 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : melatonin, MDPC-23, 분화, 석회화

서 론

Melatonin은 솔방울샘 (pineal gland)에서 분비되는 주요 호르몬으로 지금까지 melatonin에 대한 대사와 기능적 연구에 의하면 신체의 여러 생리학적 및 병태생리학적 조절에 중요한 역할을 수행한다 (Cassone 1990, Pierpaoli와 Regelson 1994, Cos와 Sanchez-Barcelo 1995, McMillen 등 1995, Batmanabane와 Ramesh 1996, Roth 등 1997, Nowak와 Zawilska 1998). Melatonin은 밤에 그 분비가 증가하여 시상하부에 의한 일간리듬 (diurnal rhythms)의 조절 (Cas-

sone 1990, McMillen 등 1995), 계절에 따라 출산을 하는 체체들에 있어서 생식의 조절 (McMillen 등 1995, Batmanabane와 Ramesh 1996), melatonin의 농도에 따라 여러 세포들의 분화에 영향 (Cos와 Sanchez-Barcelo 1995, Roth 등 1997), 연령증가에 따른 감소 (Pierpaoli와 Regelson 1994) 등을 주요한 특징으로 한다. 또한 melatonin은 유방암세포의 증식을 억제하는데 이는 밤에 일하는 여성의 경우 유방암 발생율이 더 높다 (Cos와 Sanchez-Barcelo 1995). 또한 Pierpaoli와 Regelson (1994)는 melatonin이 노화억제제 (anti-aging agent)로 작용하여 melatonin을 투여한 흰쥐에서 수명이 20% 연장되었다고 보고하였다.

Melatonin은 세 개의 transmembrane receptor (Mel R1a, -1b, -1c)를 가지고 있는데 이들 모두는 G pro-

*이 논문은 2003년도 조선대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

교신저자: 김흥중 (조선대학교 치과대학 구강해부학교실)
E-mail: hjbkim@chosun.ac.kr

tein과 결합하여 cAMP의 형성을 조절한다(Dubocovich 1995, Yung 등 1995, Reppert 등 1996). 여성의 경우 폐경기 이후에 melatonin의 분비가 감소하여 골다공증을 일으키는데 관여하고, 뼈모세포와 뼈파괴세포의 호르몬 조절에 있어서 중요한 인자로 작용한다(Cardinali 등 2003). Melatonin은 뼈모세포의 증식과 type I collagen의 합성을 촉진하고(Nakade 등 1999), 뼈모세포 전구세포인 MC3T3 세포에서 뼈모세포로의 분화와 골바탕질의 석회화를 촉진시키며, 골성장 조절에 있어 중요한 역할을 한다(Roth 등 1999).

치아의 형성은 치성상피와 외배엽성 간엽세포 사이의 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되는 복잡한 발생과정을 통해 이루어진다(Mina와 Kollar 1987). 치성상피는 치아기(dental organ)를 형성하여 법랑모세포(ameloblast)를 분화시켜 법랑질을 형성하고, 외배엽성 간엽세포는 치아유두(dental papilla)를 형성하여 상아질모세포와 치수세포를 분화시켜 상아질과 치수를 형성한다(Nanci 2003).

상아질모세포는 외배엽성 간엽세포로부터 상아질모세포 전구세포(preodontoblast)를 거쳐 상아질모세포로 분화하는 과정에 주로 type I collagen과 같은 유기바탕질과 일부 지질 및 dentin sialophosphoprotein (DSPP), dentin matrix protein (DMP), osteonectin (ON), osteocalcin (OC), osteopontin (OP) 등과 같은 비아교성 바탕질을 합성하고 분비한다(Begue-Kirn 등 1994, D'Souza 등 1997, Papagerakis 등 2002). 그러나 melatonin이 상아질모세포로의 분화 과정에 끼치는 영향에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

Nuclear factor I (NFI) family는 전사-복제 인자들로 NFI-A, NFI-B, NFI-C, NFI-X의 네 가지 유전자들로 이루어져 있으며(Chaudhry 등 1998), 많은 세포성 유전자들의 발현에 중요한 역할을 한다(Gronostajski 2000). 최근에 Steele-Perkins 등(2003)은 NFI-C를 knock out하면 생쥐에서 치아머리 부위는 정상이지만 치아뿌리가 짧거나 비정상적으로 형성된다고 하여, NFI-C가 치아뿌리 상아질 형성을 위한 상아질모세포의 분화과정에서 중요한 역할을 함을 시사하였다.

위의 여러 연구들에 기초하여 본 논문에서는 Hanks 등(1998)이 CD1 생쥐 어금니의 치아유두에서 분리한 상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포를 이용하여 melatonin이 상아질모세포에서 석회화 결절의 형성을 촉진하는지를 확인하였다. 또 melatonin이 상아질-특이 단백질 DSPP와 석회화 표지인자인 OC와 ALP 및 최근의 연구에서 상아질모세포의 분화와 관련이 것으로 알려진 NFI-C의 발현에 끼치는 영향에 대하여 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 분화

생쥐 어금니 치아유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포(Hanks 등 1998)를 5×10^5 cells/60 mm dish에서 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제 (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL 및 fungizone 2.5 µg/mL, Gibco BRL, Rockville, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's 배양액 (DMEM, Gibco BRL, Rockville, USA)에서 confluency가 될 때까지 배양하였다. MDPC-23 세포의 상아질모세포로의 분화는 5% FBS, ascorbic acid (AA: 50 µg/mL) 및 β-glycerophosphate (GP: 10 mM)가 포함된 DMEM 배양액에서 15일간 배양하였다. 실험군은 Me₂SO에 melatonin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 50 nM과 100 nM씩 녹여 첨가하였고, 대조군은 같은 양의 Me₂SO만 첨가하였다.

2. 석회화 결절의 확인

MDPC-23 세포(2.7×10^5 cells/35-mm dish)에 melatonin (50 nM과 100 nM)을 첨가한 실험군과 첨가하지 않은 대조군을 5일, 10일, 15일 후에 $1 \times$ PBS로 3회 세척하고 70% ethanol로 20분간 고정한 다음, 0.1% NH₄OH가 함유된 1% Alizarin Red-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 염색하여 석회화 결절을 3회 반복하여 확인하고 위상차 현미경

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR

Names		Primer sequence (5'→3')	Size (bp)	Tm (°C)
DSPP	S	AATGGGACTAAGGAAGCTG	714	55
	AS	AAGAAGCATCTCCTCGGC		
OC	S	CCACAGCCTTCATGTCCAAG	489	63.5
	AS	GGCAGAGAGAGAGGACAGGG		
ALP	S	CTCTCCGAGATGGTGGAGGT	450	62
	AS	GTCTTCTCCACCGTGGGTCT		
NFI-C	S	GACCTGTACCTGGCCTACTTTG	914	55
	AS	TTTCCACAAAAATGCAGGCTGG		
GAPDH	S	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	60
	AS	TCCACCACCTGTTGCTGT		

DSPP: dentin sialophosphoprotein, OC: osteocalcin, ALP: alkaline phosphatase, NFI-C: nuclear factor I-C

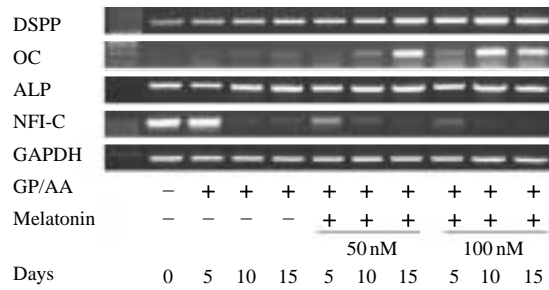


Fig. 1. Dose responses of melatonin on the expression of mRNAs for DSPP, OC, ALP and NFI-C. DSPP: dentin sialophosphoprotein, OC: osteocalcin, ALP: alkaline phosphatase, NFI-C: nuclear factor I-C, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

으로 관찰하였다.

3. 총 RNA 추출 및 RT-PCR 분석

총 RNA는 0, 5, 10, 15일 후에 Trizol reagent (Gibco BRL, Gaithersberg, MD, USA)를 이용하여 추출하였다. Superscript one-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (Invitrogene, MD, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였고, dentin sialophosphoprotein (DSPP), osteocalcin (OC), alkaline phosphatase (ALP), nuclear factor I-C (NFI-C) 및 GAPDH 특이적 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR 생성물은 1.2% agarose gel에 전기영동하여 유전자 발현을 확인하였다.

4. Densitometry 분석

RT-PCR을 수행한 각 유전자의 densitometry 분석은 Gel-Doc system (Bio-rad laboratories, Inc. CA, USA)의 differential analysis 프로그램을 이용하여 분석하였고 GAPDH로 표준화하였다.

5. 통계적 분석

각각의 실험군과 대조군의 densitometry 분석의 통계처리는 Students' t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였고, p-value가 0.05 미만일 경우 유의

한 것으로 판정하였다.

결 과

1. DSPP 유전자 발현

DSPP의 발현은 대조군과 비교하여 실험군에서 melatonin의 농도가 증가할수록 발현양이 증가하였다. Melatonin 100 nM을 처리한 군에서 5일째부터 강하게 발현하여 15일까지 일정하게 유지되었으며, 50 nM을 처리한 군에서는 초기에는 대조군에 비해 증가를 보이지 않다가 15일째 100 nM을 처리한 군과 발현양이 유사하게 증가하였다 (Figs. 1, 2).

2. OC 유전자 발현

OC의 발현은 DSPP와 유사한 양상을 보였다. 대조군에서 15일까지 일정하게 발현이 증가 하였으며, melatonin 50 nM을 처리한 군에서는 대조군과 비슷하게 증가하다가 15일째에 크게 증가하여 대조군보다 2배 정도 높은 발현을 보였다. 100 nM을 처리한 군에서는 5일째부터 대조군과 melatonin 50 nM을 처리한 군에 비교하여 발현량이 증가하여, 10일째부터 현저히 증가하였다. 15일째 melatonin을 50 nM과 100 nM을 처리한 두 실험군의 발현양이 유사하였다 (Figs. 1, 2).

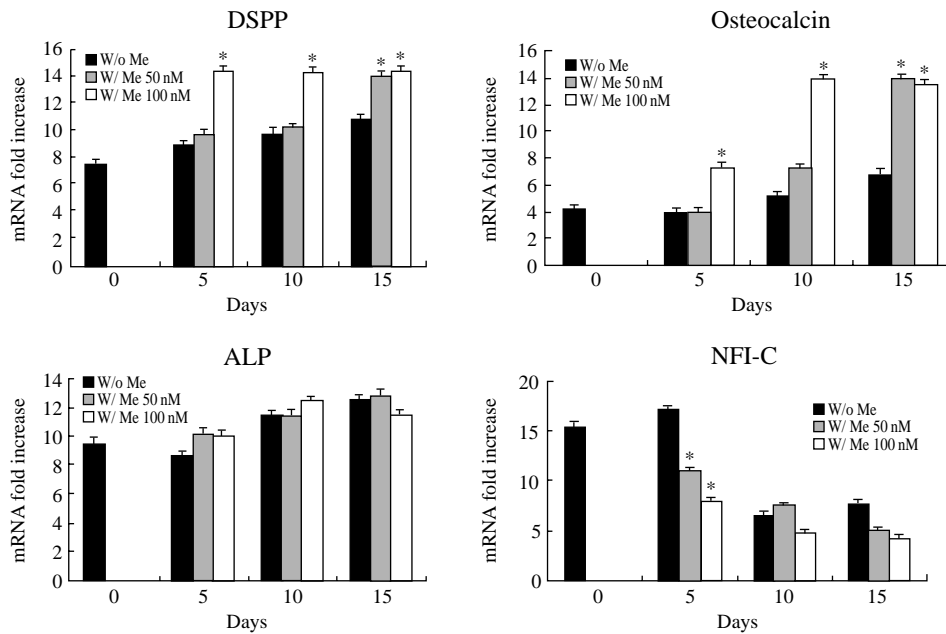


Fig. 2. A densitometric analysis of DSPP, OC, ALP and NFI-C expressions in MDPC-23 cells with or without melatonin. Results are means \pm SD from three independent experiments. *, $p < 0.05$. DSPP: dentin sialophosphoprotein, OC: osteocalcin, ALP: alkaline phosphatase, NFI-C: nuclear factor I-C

3. ALP 유전자 발현

ALP의 발현은 실험군과 대조군 모두에서 분화가 진행되는 동안 미약한 발현양의 증가를 보였으나, 각 군에서의 발현양의 차이는 보이지 않았다(Figs. 1, 2).

4. NFI-C 유전자 발현

NFI-C의 발현은 MDPC-23 세포의 분화가 진행함에 따라 발현양이 감소하였으며, 특히 melatonin을 처리한 실험군에서 대조군과 비교하여 초기의 2배 정도 빠르게 발현양이 감소함을 보였다(Figs. 1, 2).

5. 석회화결절의 형성 확인

MDPC-23 세포는 GP/AA가 첨가된 DMEM 배양액(분화 배양액)에서 상아질모세포로 분화하였다. 이들 세포는 분화 배양액에서 적어도 15일 동안 배

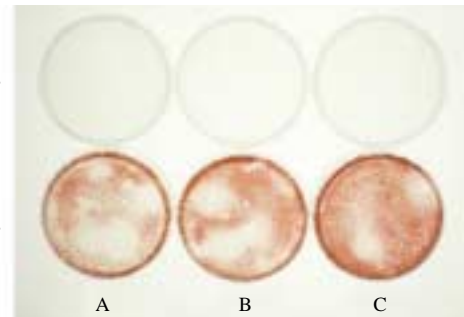


Fig. 3. Photomicrographs of Alizarin Red-S stained MDPC-23 control and melatonin-treated cells. Cultures were stained at 5 and 15 days after treatment with GP/AA only (A), melatonin 50 nM/GP/AA (B) and melatonin 100 nM/GP/AA (C). GP: β -glycerophosphate, AA: ascorbic acid

양하였을 때 석회화 결절을 형성하였다. 배양 5일째 모든 군에서 석회화 결절이 관찰되지 않았다(Fig. 3). Melatonin의 농도가 증가할수록 석회화 결절 형

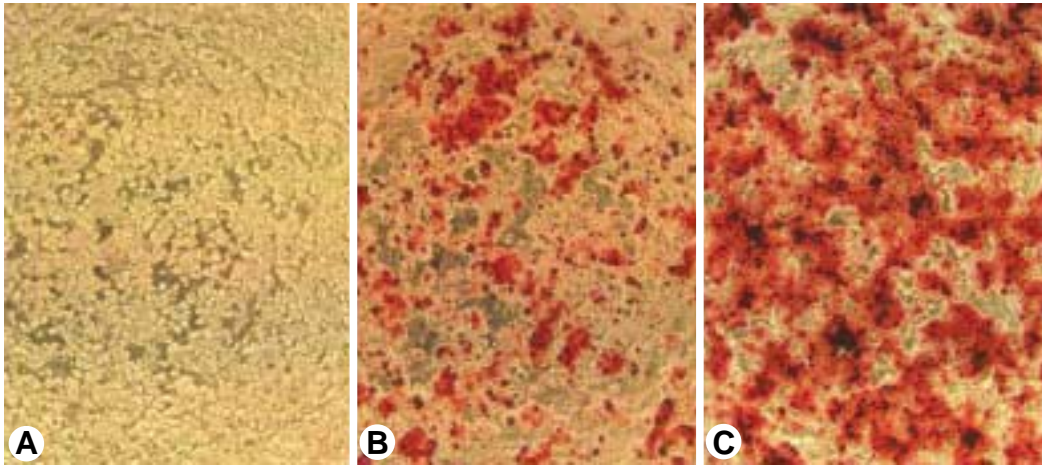


Fig. 4. Phase contrast micrographs of Alizarin Red-S stained MDPC-23 control and melatonin-treated cells. Cultures were stained at 5 (A) and 15 (B, C) days after treatment with GP/AA only (B) and melatonin 100 nM/GP/AA (A, C). GP: β -glycerophosphate, AA: ascorbic acid

성을 촉진하였는데, 분화 15일 째 melatonin을 첨가하지 않은 군에 비해 첨가한 군에서 석회화 결절 형성이 촉진되었다(Fig. 4).

고 찰

솔방울샘에서 분비되는 melatonin은 밤에 분비가 증가하여 인체의 밤과 낮의 주기조절에 관여하고 연령의 증가에 따라 그 분비량이 감소하여 노화의 진행과 밀접한 관련을 갖는다(Cassone 1990, Cos와 Sanchez-Barcelo 1995, Cardinali 등 2003). Cardinali 등(2003)은 골에 대한 melatonin의 임상적 적용에서 여성의 경우 폐경기 이후에 melatonin의 감소가 골다공증을 일으키는데 관여한다고 하여 뼈모세포와 뼈파괴세포의 호르몬 조절에 있어서 중요한 인자로 melatonin을 보고하였다. Nakade 등(1999)은 *in vitro*에서 melatonin이 뼈모세포의 증식과 type I collagen의 합성을 촉진시킨다고 하였고, Roth 등(1999)은 melatonin은 뼈모세포분화와 비탄질의 석회화를 촉진시키며, 골성장 조절에 있어 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

본 연구에서는 상아질모세포 전구세포인 MDPC-

23 세포를 이용하여 melatonin이 상아질모세포로의 분화와 석회화 결절의 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다. MDPC-23 세포는 Hanks 등(1998)이 CD1 생쥐 어금니의 치아유두에서 분리하여 만든 세포주로 일정한 조건에서 배양하면 분화하여 상아질모세포의 특성을 나타낸다(Cho 등 1992, Hanks 등 1998, Sun 등 1998). Bae 등(2005)의 실험에서도 MDPC-23 세포를 배양하여 DSPP mRNA의 발현을 관찰하였다. 이는 치아유두 세포주인 MDPC-23 세포가 상아질모세포의 특성을 나타내며, 상아질모세포의 분화과정을 연구하는데 MDPC-23 세포가 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

이 실험에서 석회화 결절 형성에 관하여 살펴보면, MDPC-23 세포에 GP/AA를 첨가하여 15일 동안 배양하였을 때 석회화가 일어났다. Melatonin의 농도가 증가할수록 석회화결절 형성을 촉진하여 분화 15일째는 melatonin을 첨가하지 않은 군에 비해 melatonin을 첨가한 군에서 석회화 결절의 형성이 강하게 관찰되었다. Roth 등(1999)은 뼈모세포 전구세포인 MC3T3 세포를 이용한 실험에서 melatonin을 첨가하지 않은 군에서는 21일이 되어야 석회화결절이 형성됨에 반하여 melatonin 50 nM을 첨가한 군에서는 12일째에 석회화 결절이 형성되었다고

하였다.

상아질모세포-특이 유전자인 DSPP는 ALP, OC과 같은 석회화 표지 단백질과 함께 상아질의 석회화를 유도한다. DSPP는 비아교성 단백질에 속하는 대표적인 상아질-특이 단백질로 하나의 유전자로부터 dentin sialoprotein과 dentin phosphoprotein의 두 가지 단백질을 합성하며 상아질의 석회화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Rutherford 등 1993, Feng 등 1998). OC는 뼈모세포, 상아질모세포, 백악모세포에 의해서 합성되는 비아교성 단백질로 석회화 후기에 주로 발현된다(Bronckers 등 1998, Papagerakis 등 2002). Alkaline phosphatase (ALP)의 활성은 모든 무기질침착 조직의 형성과 관련이 있다(Hanawa 등 1990).

본 연구에서는 MDPC-23 세포에 melatonin을 첨가하지 않은 군과 첨가한 군을 15일 동안 배양하여, 상아질의 분화와 석회화를 판단할 수 있는 지표가 되는 인자인 DSPP, OC, ALP의 발현 정도를 RT-PCR을 수행하여 분석하였다. DSPP의 발현은 대조군과 비교하여 실험군에서 melatonin의 농도가 증가할수록 발현량이 증가하였으며, 특히 melatonin 100 nM에서 5일째부터 강하게 발현하여 15일까지 일정하게 유지되었다. OC는 DSPP와 유사한 결과를 보여 주었는데 100 nM을 처리한 군에서는 5일째부터 대조군과 melatonin 50 nM을 처리한 군에 비해서 2배정도 발현량이 증가하였다. ALP는 melatonin 대조군과 실험군 모두에서 분화가 진행되는 동안 발현량이 증가하였으며, 각 군에서 큰 차이를 보이지 않았다.

Roth 등(1999)은 MC3T3 세포에 melatonin을 첨가한 경우에는 첨가하지 않은 군에 비해 뼈모세포-특이 유전자인 BSP와 ALP, OP, OC와 같은 다른 석회화 표지자들의 유전자 발현이 증가하였다고 보고하였다. 또한 melatonin은 세 개의 막투과 수용체를 가지고 있는데 뼈모세포 분화가 이들 수용체에 의해 조절되는지를 규명하기 위하여 막투과 수용체에 경쟁적 억제제(competitive inhibitor)인 luzindole과 함께 처리한 실험에서 luzindole은 melatonin에 의해 유도된 BSP와 ALP의 발현을 감소시킨다고 보고하였다. 앞으로 상아질모세포에서도 막투과 수

용체의 억제제에 의해서 melatonin의 효과가 감소되는지 연구가 필요하다고 생각된다. 위의 두 연구에 의하면 melatonin은 뼈모세포에서와 비슷하게 상아질모세포의 분화와 석회화를 촉진함을 알 수 있다.

NFI-C는 치아 발생과정에서 외배엽성 간엽세포에는 발현되지 않으나, 상아질모세포 전구세포에서 발현되기 시작하여 상아질모세포의 분화가 진행되어 감에 따라 발현이 증가한다(Steele-Perkins 등 2003). NFI-C가 상아질모세포 뿐만 아니라 뼈모세포에도 발현되지만 NFI-C(-/-) 생쥐에서 치아뿌리 상아질 형성에만 이상이 초래된 것은, NFI-C가 상아질모세포에만 선택적으로 작용함을 의미한다(Steele-Perkins 등 2003). Bae 등(2005)의 연구에 의하면 NFI-C(-/-) 생쥐의 상아질모세포는 키가 작고 타원형 모양으로 세포 극성이 상실되는 등 매우 불규칙한 양상을 보였다. 이 결과는 NFI-C 유전자의 결손이 일어나면 세포사이 결합장치의 형성이 방해되어 상아질모세포가 비정상적으로 분화하고, 이에 따라 비정상적인 상아질이 형성되는 것으로 생각할 수 있다.

Bae 등(2005)은 MDPC-23 세포에서 NFI-C를 과 발현 시킨 3일 후에 DSPP mRNA의 발현이 증가함을 확인하였다. 이는 DSPP가 상아질모세포의 분화 후기에 발현이 증가한다는 것을 생각하면, NFI-C에 의해 DSPP의 발현이 촉진되었음을 의미한다. 본 연구에서는 NFI-C는 MDPC-23 세포가 분화함에 따라 발현량이 감소하였으며, 특히 melatonin을 처리한 군에서 두 배정도 빠르게 발현량이 감소함을 보여 주었다. 위의 결과들은 NFI-C가 상아질모세포의 분화 초기에 작용함을 의미하며, melatonin에 의해서 상아질모세포의 분화가 촉진됨에 따라 NFI-C의 작용도 그와 비례하여 빨라지는 것으로 생각된다.

위의 결과들을 종합하면 melatonin은 상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포의 분화와 석회화를 촉진시키며, 상아질 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Bae HS, Kim HJ, Jeong MJ, Park MJ, Ahn SM, Gronostajski

- RM, Park JC : Role of nuclear factor I-C in odontoblast differentiation. *Kor J Oral Maxillofac Pathol* 29: 83-92, 2005. (in Korean)
- Batmanabane M, Ramesh KP : Effect of exogenous melatonin on the onset of puberty in female albino rats. *Anat Rec* 245: 519-524, 1996.
- Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H : Comparative analysis of TGF- β s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 38: 405-420, 1994.
- Bronckers AL, Price PA, Schrijvers A, Bervoets TJ, Karsenty G : Studies of osteocalcin function in dentin formation in rodent teeth. *Eur J Oral Sci* 106: 795-807, 1998.
- Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C : Melatonin effect on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 34: 81-87, 2003.
- Cassone VM : Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* 13: 457-464, 1990.
- Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM : Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev Dyn* 208: 313-325, 1998.
- Cho MI, Matsuda N, Lin W-L, Moshier A, Ramakrishnan PR : In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif Tissue Res* 50: 459-467, 1992.
- Cos S, Sanchez-Barcelo EJ : Melatonin inhibition of MCF-7 human breast-cancer cells growth: influence of cell proliferation rate. *Cancer Lett* 93: 207-212, 1995.
- D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M : Gene expression patterns of murine dentin matrix protein (DMP1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct development function *in vivo*. *J Bone Miner Res* 12: 2040-2047, 1997.
- Dubocovich ML : Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 16: 50-56, 1995.
- Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'Souza RN, Kozak CA, MacDougall M : Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem* 273: 9457-9464, 1998.
- Gronostajski RM : Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* 249: 31-45, 2000.
- Hanawa M, Takano Y, Wakita M : An autoradiographic study of calcium movement in the enamel organ of rat molar tooth germ. *Arch Oral Biol* 35: 899-908, 1990.
- Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT : Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci* 106 (suppl I): 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.
- McMillen IC, Houghton DC, Young IR : Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity. *J Reprod Fertil* 49(suppl): 137-146, 1995.
- Mina M, Kollar EJ : The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 32: 123-127, 1987.
- Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T : Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. *J Pineal Res* 27: 106-110, 1999.
- Nanci A : Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed., St. Louis, Mosby, pp. 78-103, 2003.
- Nowak JZ, Zawilska JB : Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharm World Sci* 20: 18-27, 1998.
- 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.
- Pierpaoli W, Regelson W : Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci* 91: 787-791, 1994.
- Reppert SM, Weaver DR, Godson K : Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17: 100-102, 1996.
- Roth JA, Kim BK, Lin WL, Cho MI : Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 274: 22041-22047, 1999.
- Roth JA, Rabin R, Agnello K : Melatonin suppression of PC12 cell growth and death. *Brain Res* 768: 63-70, 1997.
- Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M : Induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 38: 571-576, 1993.
- 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.
- 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. *Connective Tissue Res* 37: 251-261, 1998.
- Yung LY, Tsim S-T, Wong YH : Stimulation of cAMP accumulation by the cloned *Xenopus* melatonin receptor through Gi and Gz proteins. *FEBS Lett* 372: 99-102, 1995.

Abstract

Effects of Melatonin on MDPC-23 Cells Differentiation

**Joo-Cheol Park, In-Cheol Shin, Dong-Seol Lee, Seong-Ho Yoon,
Jae-Ho Yang, Sang-Bong Kim, Heung-Joong Kim**

Oral Biology Research Institute & Post BK21, College of Dentistry, Chosun University

Melatonin is the major hormone released from the pineal gland and regulates a variety of physiological and pathophysiological processes. According to the recent studies the melatonin plays an important role in regulation of bone growth. The purpose of this study was to determine whether melatonin promotes the cell differentiation and nodules formation in MDPC-23 pre-odontoblast cell line.

MDPC-23 cells were cultured for up to 15 days in growth media containing differentiation medium with melatonin or without melatonin. Cultures were stained with Alizarin-S. The expression of the mRNAs for DSPP, OC, ALP and NFI-C were analyzed by RT-PCR.

The results were as follows. Cultures containing melatonin at day 15 showed extensive mineralization as compared with control cultures. Melatonin increased the expression of DSPP and OC mRNAs in MDPC-23 cells in a concentration-dependent manner. However, melatonin did not changed ALP expression. Melatonin markedly decreased mRNA expression of NFI-C in early stage cultures as compared with control cultures.

These results demonstrated that melatonin is capable of promoting MDPC-23 cells differentiation and mineralization and suggested that melatonin may play an important role in dentin formation.

Key words : Melatonin, MDPC-23, Differentiation, Mineralization