

Interferon- γ 가 치주인대 세포의 Collagen 및 Fibronectin의 합성과 Alkaline Phosphatase 활성에 미치는 영향

김광석¹⁾, 성재현²⁾, 최제용³⁾, 류현모⁴⁾

I. 서 론

교정력에 의한 치아의 이동은 치아주위의 연조직과 경조직의 재형성을 필요로 하는 일련의 과정으로, 치아에 가해지는 생리적인 또는 기계적인 힘에 의해 치아와 치아를 둘러싼 주위조직이 세포활동을 매개로 적응해 가는 일련의 골 개조 과정이다. 과거의 교정 치료는 치아의 이동을 성취하기 위하여 경험에 의한 역학적인 시도로 발전되어 왔으며, 진단방법, 악교정수술 및 교정 장치의 발달로 현재에 비교적 만족할 만한 치료 결과를 얻고 있다. 그러나 아직도 치료기간이 너무 길다는 점, 개인차에 따른 치아 이동량과 부작용을 예측하기 힘들다는 점, 또 치료가 종결된 후의 재발을 포함한 부적절한 치아의 이동이 일어날 수 있다는 점 등, 기계적인 힘 만으로는 만족할 만한 결과를 얻기 어렵다. 따라서 세포 수준에서의 골 개조에 관한 많은 생화학적 이해가 요구된다고 하겠다. 이러한 견지에서 연구된 예로 Mostafa 등(1983)은 교정력에 의한 골 개조 과정에서 PGE₂ 및 세포내 이차전령 물질인 cAMP의 역할에 관한 가설을

발표한 바 있으며, Davidovichi 등(1988) 그리고 Ngan 등(1987)도 여러인자의 cAMP를 경유한 골 개조에 관한 연구로 골 개조 기전을 밝히려는 노력이 시도되고 있다.

세포 수준에서 골 개조를 야기하는 인자는 크게 두 가지로 전신적 인자와 국소적인자로 대별되는데, 전신적 인자는 parathyroid hormone(PTH), 1, 25-dihydroxy vitamin D₃, calcitonin, estrogen 및 glucocorticoid 등 호르몬들이 여기에 속한다(Chamber 등, 1985; Raisz, 1988; Chamber, 1988). 이들의 골대사에 미치는 영향은 신체 모든조직에 광범위하게 나타나며, 국소 부위에 국한되지 않는다. 최근의 연구에 의하면 교정력에 의한 치아의 이동과 같은 국소적인 골대사에는 그 부위에서 생성되는 국소인자의 중요성이 강조되고 있다. 여기에는 interleukin-1(IL-1), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin like growth factor-1(IGF-1), arachidonic acid 대사물질인 prostaglandins(PGs)과 leucotrienes(LTs) 그리고 interferon- γ (IFN- γ) 등이 있다(Krane, 1988; Watrous and Andrews, 1989; Ngan 등, 1988; Stashenko 등, 1989). 상기 인자들 중 vitamin D₃(Collins, 1988), PGs(Lee, 1990), LTs(Mohammed 등, 1989) 및 PGs 생성을 억제시키는 약제인 indomethacin(Chumbley와 Tuncay, 1986) 등은 국소 및 전신적 투여로 치아의 이동 속도를 조절할

접수일: 1993년 2월 1일

1): 경북대학교 치과대학 치과교정학 교실

2): 경북대학교 치과대학 치과교정학 교실, 교수

3): 경북대학교 치과대학 구강생화학 교실

4): 경북대학교 치과대학 구강생화학 교실

수 있다는 결과를 보고한 바 있어 이러한 인자들의 임상 치료에의 가능성을 시사하고 있다.

IFN- γ 는 immune interferon 혹은 type II interferon이라고도 불리워 지는 활성화된 T-림파구에 의해 주로 합성되는 cytokine이다. IFN- γ 는 mononuclear phagocyte의 강력한 활성제로 작용하고, 세포표면에 major histocompatibility complex(MHC)의 발현을 증가시키고, T-림파구와 B-림파구에 직접 작용하여 이들의 성장 및 분화를 촉진하며, 중성구와 natural killer 세포를 활성화 시키는 등(Abbas 등, 1991) 면역 기능과 관련된 백혈구의 전반적인 활성을 증가시키는 작용을 나타내며, 또한 이러한 기능을 통하여 항바이러스 작용, 항암 작용 및 항증식 작용을 나타낸다고 한다(Gresser, 1990).

IFN- γ 는 상기와 같은 면역에 관련된 기능 외에 염증 이후에 후유증으로 발생하는 섬유증을 억제하는 인자로도 인식되고 있는데, 사람 피부의 섬유아 세포(Rosenbloom 등, 1984; Duncan과 Berman, 1985; Czaja 등, 1987; Scharffetter 등, 1989), rheumatoid 활막세포(Stephenson 등, 1985), 사람 치은의 섬유아 세포(Narayanan 등, 1989), 간세포(Czaja 등, 1989) 및 폐 섬유 아세포(Derdak 등, 1990) 등 여러종류의 배양된 세포에 IFN- γ 를 투여하여 교원질 합성이 억제됨이 보고된 바 있으며, 대부분의 연구에서 교원질 합성의 억제는 세포내 교원질 mRNA의 양적 감소와 상관이 있는 것으로 알려져 있다. Shapiro 등(1989)은 IFN- γ 에 의해 collagenase의 유전자 발현이 억제됨을 보고하여 IFN- γ 에 의해 교원질의 합성이 감소되는 것 뿐만 아니라 분해도 억제되어, 이것에 의하여 결합조직의 대사가 억제되는 결합조직 안정화 효과가 있음을 보고하였다. 또한 Granstein 등(1989)은 마우스에 IFN- γ 를 직접 투여함으로써 연조직에서의 섬유화 현상이 억제됨을 조직학적으로 관찰한 바 있다. 따라서 IFN- γ 는 in vitro 뿐 아니라 in vivo에서도 교원질

대사를 억제하는 효과가 있음이 판명되었다.

한편 Gowen과 Mundy(1986)는 마우스 두개골의 조직배양에서 IFN- γ 는 골흡수를 억제하는 효과가 있음을 보고하였고, Lerner 등(1991) 역시 마우스 두개골의 조직배양 실험에서 IFN- γ 가 parathyroid hormone, cholera toxin, forskolin 같은, 세포내 cyclic AMP를 증가시키는, 약제에 의해 유발된 골흡수를 억제하는 효과가 있음을 보고하였다. 또한 Nanes 등(1989)은 rat osteosarcoma(ROS) 세포배양 실험에서, Bresford 등(1990)은 정상인의 골세포와 human osteosarcoma(HOS) 세포배양 실험에서 IFN- γ 에 의해 세포의 증식과 골조직의 기질인 교원질의 합성이 억제되는 것을 관찰하였으며, Nanes 등(1990)은 ROS세포에서 활성화된 vitamin D₃에 의해 유도된 bone Gla protein의 합성을 억제함을 관찰하여, 골조직에서도 IFN- γ 는 골기질 합성을 억제하고 골흡수 또한 억제하는 골조직을 안정시키는 작용이 있음을 보고하였다.

Reitan(1959) 그리고 Rygh(1986)는 교정력에 의한 치아 이동시 치조골의 변화에 대한 조직학적 고찰을 통하여, 교정력은 치주인대를 통하여 전달되고, 치주인대 및 그곳에 존재하는 세포들을 잘 관찰하는 것이 치아의 이동 이전에 관한 의문을 해결할 수 있는 방법으로 생각한다고 제시한 바 있으며, Roberts 등(1981)은 치아의 이동이란 결국 치주인대에 존재하는 전구세포가 활성화 되고 성장 분화되어 골재형성에 직접적인 역할을 하는 조골세포와 파골세포로 된다고 주장하여, 교정력에 의한 골 개조에서 치주인대세포의 중심적 역할을 강조한 바 있다.

그러나 현재까지 치주인대 세포의 결합조직 기질의 대사에 IFN- γ 가 미치는 영향에 대하여 관찰한 보고는 없었으며, 만일 IFN- γ 가 섬유아세포나 골세포에서처럼 결합조직을 안정화 시키는 효과가 치주인대 세포에서도 판명된다면, 치주인대 세포를 통한 치조골의 재형성에 의존하는 교정치료에 이 cytokine을 투여함으로써, 치아의 이동 시 교정

원 준비 및 치료후의 재발 방지 등에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료되어, 치주인대 세포를 primary culture하여 이 세포의 성장, 교원질 합성, fibronectin 합성 및 이들의 mRNA의 변동 등 결합조직 합성에 미치는 IFN- γ 의 효과를 중심으로 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

재료

Dulbecco's modified Eagle medium(Gibco사, 미국), fetal bovine serum(Gibco사, 미국), trypsin, bovine serum albumin(Type V), ascorbic acid, dimethyl sulfoxide, highly purified bacterial collagenase(type VII), Sodium paranitrophenyl-2-phosphate, paranitrophenol, nonident F-40, salmon sperm DNA, ficoll-400, polyvinyl pyrrolidone, formamide, agarose, anti-fibronectin antibody, peroxidase conjugated anti-goat IgG(이상 Sigma사, 미국) 및 Eco-Ri, Bam-Hi, Hind-III, lamda DNA, agarose와 nitrocellulose membrane을(이상 Bio-Rad사, 미국)사용하였다. Random primed DNA labeling kit는 Boehringer Mannheim사(독일), guanidine isothiocyanate는 Fluka사(스위스), tissue culture plastic dishes는 Costar사(미국), Sephadex G-50와 gelatin-Sepharose 4B는 Pharmacia사(스웨덴), polystyren microtiter plate는 Flow laboratories사(미국), L-[^3H]proline(12.4 Ci/mmol), [methyl- ^3H]thymidine(6.7 Ci/mmol), [^{32}P]deoxy-CTP((3000Ci/mmol)는 NEN사(미국) 제품을 사용하였다. 본 실험에 사용한 유전자 제조합형 인간 interferon- γ 는 럭키금성사(한국) 제품을 사용하였고 기타 시약들은 시판되는 일급시약들을 구입하여 사용하였다.

방법

1. 세포배양

교정치료를 위하여 발거한 상악좌측 제일 소구치에서 치주인대 조직을 다음과 같이 채취하였다. 치근 및 치경부측 1/3을 큐렛으로 제거한 후 치아를 배양액 [100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin 및 10% fetal bovine serum(FBS) 이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)]에서 수 회 씻고 치근의 중간 1/3부위의 치주인대를 채취하여 세절한 다음 35mm 세포 배양접시에 고르게 분산시켰다. 그후 37°C, 100%, 습도 5% CO₂가 유지되는 공기 흡입 배양기에서 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 밀생할 때까지 배양하였다. 세포가 밀생상태를 이루면 1:3으로 계대배양하였고 일부는 5-10% dimethyl sulfoxide(DMSO)가 함유된 배양액에 분산하여 냉동 후 액체질소 탱크에 보관하였으며, 이때 배양된 세포를 치주인대 세포로 칭하였다. 본 실험에서는 3세대에서 13세대 사이의 세포를 사용하였다.

2. DNA 합성능 측정

치주인대 세포를 1×10^5 cells/ml이 되게 24 well plate에 넣고 3일간 배양하여 육안적인 밀생상태가 되게 하였다. 여기에 10, 100, 1000 U/ml 농도의 IFN- γ 와 $1 \mu\text{Ci/ml}$ 의 [^3H]thymidine을 첨가하여 24시간 또는 일정기간 동안 배양하였다. 세포배양액을 제거한 세포층을 phosphate buffered saline(PBS)으로 3번 씻은 후 10% trichloro-acetic acid(TCA)를 1 ml 넣고 4°C에서 20분간 방치하였다. 그후 5% TCA로 2회 세척하고 찬 ethanol 1 ml를 넣어 씻고 실온에서 건조시켰다. 이렇게 준비된 세포층에 $500 \mu\text{l}$ 의 2% Na₂CO₃가 든 0.1 N NaOH를 넣어 세포를 완전히 녹여 5 ml scintillation vial에 옮겨 β -counter(Packard사, 미국)로 측정하였다. 측정된 값은 DPM(disinte-

gration per minute)으로 환산하여 표기하였다.

3. DNA 양 측정

DNA양은 Labarca와 Paingen(1980)방법을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 4항의 교원질 합성능 평가에 사용된 24 well plate의 총 시료량 중에서 $100\mu\text{l}$ 를 취하여 5ml 용량의 polypropylene관에 넣고 DNA양을 측정하였다. 표준용액으로는 송아지의 흉선 DNA(1mg/ml)를 25, 50, 100, 500, 1000 및 2000ng 되게 만들어 2N NaCl이 들어있는 phosphate saline 완충액(0.05M NaPO_4 , pH 7.4)으로 2ml 되게 하였다. Hoechst 33258(Fluka사, 미국)이 마지막 $0.2\mu\text{g/ml}$ 되게 2 ml phosphate saline 완충액을 더 넣어주었다. Parafilm으로 시료가 든 관을 막고 잘 섞은 후 분광형광광도계(Spectrofluorometer MK-2, Farrand사, 미국)로 excitation 356nm, emission 458nm의 파장에서 측정하였으며, 단위는 24 well 세포배양 용기 한 well당 존재하는 세포의 DNA 양을 μg 단위로($\mu\text{g/well}$) 나타내었다.

4. 총단백질과 교원질 합성능 측정

치주인대 세포를 24 well plate에 1×10^5 cell/ml이 되게 넣고 3일간 배양하면서 육안적인 밀생상태가 되게하였다. 밀생상태가 된 후에 $50\mu\text{g/ml}$ 의 ascorbic acid, $2\mu\text{Ci}$ 의 [^3H] proline 및 일정 농도의 IFN- γ 가 들어있는 배양액 1ml를 넣어주고, 일정시간 후에 $5 \times$ collagenase 완충액(0.25M Tris , 0.025M CaCl_2 와 $0.0125\text{M N-ethylmaleimide}$, $100\mu\text{M PMSF}$, pH 7.4)을 각 well에 $250\mu\text{l}$ 씩 넣어서 측정할 때까지 -70°C 에 보관하였다. 총단백질과 교원질 양의 측정은 Peterkofsky와 Diegelmann(1971)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다.

24 well plate의 각 well의 세포층을 초음파 분쇄기로(Fisher사, 미국) 30초간 마쇄한 후,

1 ml씩을 취하여 5ml의 polypropylene 관에 넣고 2mg/ml 의 bovine serum albumin(BSA) $200\mu\text{l}$ 와 50% TCA/ 5mM proline 용액 $300\mu\text{l}$ 를 첨가하여 잘 섞었다. 4°C 에 30분 방치한 뒤 $1000 \times g$ (Sorvall RT 6000, 미국)속도로 5분간 원침하여 상청액을 제거했다. 침전물에 5% TCA/ 1mM proline 1ml첨가하고 잘 교반한 후 같은 속도로 원침하였다. 위와같이 3번 세척한 후 원침하여 생긴 침전물을 0.2N NaOH에 녹이고, 1M HEPES 완충액(pH 7.2) $130\mu\text{l}$ 를 첨가하여 중화시킨 후 $5 \times$ collagenase 완충액 $100\mu\text{l}$ 를 넣었다. 이 혼합용액을 2개의 미세원침관에 각각 $250\mu\text{l}$ 씩을 넣고 한 쪽 관에는 15 U의 collagenase가 함유된 완충액 $15\mu\text{l}$ 를 넣고 다른 관에는 collagenase가 들어있지 않은 완충액 $15\mu\text{l}$ 를 넣었다. 각각을 잘 섞은 후 37°C 수조관에 90분 동안 충분히 반응시킨 뒤 0°C 로 냉각시키고, 50% TCA/ 2.5% tannic acid $50\mu\text{l}$ 를 첨가하여 잘 섞은 후 4°C 에서 30분간 방치하였다. 교원질 양은 collagenase로 처리된 관의 상청액과 한 번 씻은 액을 합하여 함께 측정된 값에서 총단백질 합성능에 해당되는(collagenase 처리 하지 않은) 관의 상청액과 한 번 씻은 액을 측정된 값을 뺀 값으로 하였다. 총단백질양은 collagenase 처리하지 않은 관의 침전물을 $100\mu\text{l}$ 의 0.2N NaOH에 녹여 5ml scintillation vial에 넣어 측정 하였다. 총단백질 합성에 대한 교원질 합성의 상대적 비율은 다음의 공식에 의거하여 계산하였다(Peterkofsky and Prater, 1974).

$$\text{Percent of Collagen} = \frac{\text{collagen(dpm)} \times 100}{[\text{noncollagen(dpm)} \times 5.4 + \text{collagen(dpm)}]}$$

비교원성 단백질의 합성능은 총단백질양에서 교원성 단백양을 뺀 값으로 평가 하였다.

5. RNA 추출

1×10^6 cells/10 mm plate가 되도록 접종한 후 밀생상태가 되게 하였다. IFN- γ (1000 U)

ml)를 24시간 처리한 후 DNA를 Chomczynski와 Sacchi(1987)의 방법에 따라 다음과 같이 분리하였다. 100mm dish의 세포층을 찬 PBS로 씻은 후 변성용액(GIT: guanidium isothiocyanate solution)을 각 dish당 600 μ l씩 넣어 세포층을 완전히 녹였다. GIT 처리된 용액을 2ml의 미세원침관에 옮긴 후 충분히 tapping 하였고, 여기에 1/10 용량의 2M sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 같은 양의 water-saturated phenol을 넣어 다시 잘 섞었다. GIT 용액의 0.2 용량의 chloroform/isoamylalcohol(49:1)을 넣고 10초간 강하게 교반하였다. 15분 동안 얼음에 방치한 후 미세원침분리기로 15000 rpm(한일, 한국)에서 20분 동안 원심분리하여 상청액 약 650 μ l를 다른 미세원침관에 옮기고 같은 양의 찬 isopropanol로 섞어 -20°C 에서 1시간 이상 방치하였다. 그 후 같은 조건으로 원침한 후 침전물을 찬 70% ethanol로 씻고, 상온에서 15분 정도 방치하여 말린 후 물을 각각 50 μ l씩 넣어 녹였다. 그 중에서 RNA양은 두개의 미세원침관에 각각 5 μ l씩을 취하여 물 800 μ l를 첨가하여 잘 섞은 뒤 U. V spectrophotometer(Gilford사, 미국)로 260/280 nm에서 흡광도를 잰 후 RNA양과 순도를 계산하여 다음 실험에 사용하였다. 위의 방법으로 분리한 RNA의 평균순도는 1.851 ± 0.045 로써 이상치 2.0에 근접한 비교적 고순도의 RNA를 얻었다.

6. cDNA 준비

본 실험에 사용된 cDNA는 Hf677(Chu 등, 1982)과 pFH1(Kornblihtt 등, 1983)이었다. HF677은 Eco-RI로 처리하여 1.8kb의 cDNA insert를 확인할 수 있었고, pFH1은 Eco-RI이나 Bam-HI로 처리하여 2.3 kb의 cDNA insert를 확인할 수 있었다. pFH1의 벡터는 PAT 153이었다. cDNA insert 준비는 Sambrook 등(1989)과 Ausubel 등(1987)의 방법을 약간 변경하여 다음과 같이 시행하였다.

6-1. Plasmid 소량분리

Hf677과 pFH1이 든 *E. coli*를 agar plate(1.5% agar in LB media)에 접종시켜 37°C 에서 24시간 배양시켰다. 배양한 plate에 형성된 colony 중 하나를 선택하여 35 $\mu\text{g/ml}$ 의 ampicillin이 들어있는 L-broth 5ml에 접종하고 37°C 에서 흔들면서 하룻밤 동안 배양하였다. 이 배양액 1.3 ml를 미세원침관에 옮기고 미세원침기로 20초 동안 원침시키고 난 후 상청액을 완전히 제거하였다. 남아있는 세포침전물에 300 μ l의 STET용액(8% sucrose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 μg lysozyme)을 넣어 잘 섞은 후 얼음 속에 10분간 둔 다음 2분 정도 끓이고, 상온에서 15,000 rpm으로 20분간 원침시켰다. 이 상청액을 다른 미세원침관에 옮기고 같은 양의 찬 isopropyl-alcohol 200 μ l를 넣어 -20°C 에서 30분간 방치하여 plasmid DNA를 침전시킨 후 원침시킨 후 원침하여 분리하고, 이것을 차가운 70% ethanol로 씻은 후 상온에서 15분간 방치하여 건조시켰다. 분리된 plasmid는 50 μ l의 TE 완충액(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 사용하였다.

6-2. 전기영동 및 cDNA insert 확인

6-1항의 방법으로 얻은 plasmid가 들어있는 용액 5 μ l에 Eco-RI 0.5 μ l(5 units)와 그 완충용액 2 μ l를 가하고 12.5 μ l의 재증류수를 넣어 섞은 후 37°C 에서 하룻밤 동안 반응시켜 다음과 같이 1% agarose gel로 전기영동을 실시하였다. Agarose gel 전기영동은 Bio-Rad사(미국)의 horizontal electrophoresis chamber를 사용하여 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 시행하였다. 수평판 위에 5×10 cm의 gel casting plate를 scotch tape로 양면을 막은 뒤 7well의 comb을 설치하였다. 40ml의 TAE 완충액(40mM Tris-Cl, pH 7.2, 20mM Na-acetate, 1mM EDTA)에 agarose를 1%가 되도록 넣었다. 전열기에서 agarose를 완전히 녹이고 재증류수를 가하여 용량을 맞춘 후 50°C 로 식혔다. 여기에 ethidium bromide가 0.5

$\mu\text{g/ml}$ 되게 넣은 뒤 수평판 위에 설치한 gel casting tray에 agarose용액을 부어 굳힌 후 running plate를 TAE 완충액이 들어있는 전기영동 chamber에 넣고 50 V의 전압에서 4 시간 동안 전기 영동하여 cDNA를 확인하였다.

6-3. Plasmids 대량분리

Plasmids 대량분리는 Birnboim과 Doly (1979)의 방법을 약간 변경하여 다음과 같이 실시하였다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 ampicillin이 함유되어 있는 L-broth 25ml에 6-2항의 방법으로 확인된 균주용액을 0.1 ml 넣고 37°C가 유지되는 orbital shaker(비전과학, 한국)에서 흔들면서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 항생제가 들어있는 500ml의 L-broth에 late log culture상태인 배양 균주용액 25ml를 넣고 600 nm에서 흡광도가 0.4가 될 때까지 세차게 2 시간 30분 동안 흔들어 주었다. 이 배양액에 chloramphenicol 용액(34 mg/ml in ethanol) 2.5ml를 넣어 170 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되게 하고 12-16시간 동안 같은 방법으로 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 4°C에서 4,000×g로 10분간 원심시켜 E. coli를 모았다. 이 침전물에 4°C로 냉각된 STE 완충용액(0.1M NaCl, 10mM Tris-Cl, pH 7.8, 1mM EDTA) 50ml를 첨가하여 E. coli를 부유시킨 후 다시 4°C에서 4,000×g로 원심분리하여 E. coli를 침전시켰다. 이 침전물에 lysozyme 용액(50mM glucose, 25mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 5mg/ml lysozyme) 10ml를 가하여 잘 섞고 실온에서 5분간 방치한 후, 사용직전에 만든 alkaline 용액(0.2N NaOH, 1% SDS) 20ml를 넣어 섞은 다음 얼음속에서 10분간 방치하였다. 찬 3M potassium acetate 용액(pH 4.8) 15ml를 넣어 섞고 다시 얼음속에서 10분간 두었다. 4°C에서 20분간 12,000×g로 원심하여 얻은 상청액에 0.6 용량의 isopropyl alcohol을 가하여 섞은 후 실온에서 15분간 방치한 다음 상온에서 12,000×g로 30분간 원심시켜 침전물을 얻었다. 이 침전물을 70% ethanol로 한

번 씻어 말린 후 1ml TE 완충액을 넣어 녹였다.

6-4. cDNA 분리

6-3항의 방법으로 분리한 plasmid를 제한 효소로 처리하여 위의 방법과 같이 전기영동하였다. cDNA band를 면도날로 오려 15ml plastic 판(Costar, 미국)에 넣고 유리봉으로 잘게 마쇄하고 여기에 같은 양의 phenol/chloroform(24 : 1, v/v)용액을 넣고 10분간 강하게 교반하였다. 이것을 liquid nitrogen에 1분 정도 담근 후, 상온에서 15,000 rpm으로 10분간 원심하였다. 이것을 다시 교반하여 한번 더 위와같이 반복하여 원심한 후 상청액을 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1)로 추출하고 1/10 용량의 3M Na-acetate(pH 5.2)와 2배의 ethanol을 넣어 -20°C에 1시간 둔 뒤 10,000rpm으로 10분간 원심하였다. 적당량의 TE완충액으로 녹여 3항의 방법으로 cDNA양을 측정하였다. Labeling 하기에 적당한 농도로 분주하여 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

7. Northern blot hybridization

7-1. 기구와 실험용액 제조

RNA 실험과 관련된 모든 기구는 0.1% diethylpyrocarbonate(DEPC) 용액에 하룻밤 동안 담궈 두었다가 완전히 멸균건조시킨 후에 사용하였다. 원심분리관과 자동피펫용 tip은 미리 siliconization한 후 위와같이 처리하였다. RNA 실험에 관련된 모든 용액은 0.01% DEPC를 처리한 재증류수로 만들어 멸균하여 사용하였다.

7-2. RNA 전기영동

세포로부터 분리한 총 RNA는 다음과 같이 준비하여 전기영동하였다. 총RNA는 5 $\mu\text{g/well}$ 이 되도록 500 μl 짜리 미세원심판에 넣고, 여기에 2 μl 의 10 x running 완충액 [0.2 M sodium morpholinopropane sulfonate (MOPS,

pH 7.0), 80mM sodium acetate, 10mM EDTA (pH 8.0)], 3.5 μ l의 formaldehyde, 10 μ l의 formamide, 그리고 재증류수로 총 20 μ l가 되도록 하여 섞은 뒤 65°C에서 15분간 방치하였다. 얼음에서 식히고 2 μ l의 gel loading 완충액 [50% glycerol, 1mM EDTA(pH 8.0), 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF]을 넣어 formaldehyde agarose gel 전기 영동을 Ausubel등(1987)의 방법에 따라 시행하였다. 0.35g의 agarose에 재증류수 20.8 ml를 넣어서 무게를 잰 후 10ml 정도 재증류수를 더 첨가하여 끓여서 완전히 녹인다. 이것을 60°C로 식히고 무게를 측정해 양을 재확인하고 3.5ml의 10 x gel running 완충용액, 10.7ml의 37% formaldehyde(마지막 2.2 M 되게 함), 0.7 μ l의 ethidium bromide(10 mg/ml)를 첨가하여 섞은 뒤 6-1항과 같이 gel running plate에 이 용액을 붓고 agarose를 굳혔다. 이와같이 하여 gel이 만들어지면 전기영동조에 1x running 완충액을 채우고 formaldehyde agarose gel을 설치한 다음 5V/cm로 5분간 prerun을 시켰다. 그후 시료를 각 well에 가하고 4v/cm로 4시간 전기영동하였다.

7-3. Northern blot 실험

전기영동이 끝나면 전기영동조에서 gel을 꺼내어 재증류수에 몇 번 세척하여 formaldehyde를 제거하고, UV transilluminator에서 관찰하고 사진을 찍은 다음 RNA의 transfer를 증진시키기 위해 0.05N NaOH에 20분간 gel을 담구어 RNA의 부분적인 수화절단을 하였다. 다시 재증류수로 gel을 씻고 45분간 20 x SSC (3M NaCl, 0.3M Na₃ Citrate-2H₂O, pH 7.0)용액중에 두었다. 20 x SSC가 들어있는 용기에 유리판을 걸쳐 놓고 이 용액에 적신 Whatman 3MM 종이를 유리판 위에 올려 10ml 피펫으로 종이를 압착하여 기포를 제거하였다. 이 종이 위에 agarose gel을 윗면이 종이 쪽으로 향하도록 뒤집어서 올려놓았다. Nitrocellulose membrane(NC)를 재증류수에 완전히 적시

고, 20 X SSC에 5분간 담근 후 agarose gel위를 덮어 피펫으로 기포를 제거하였다. 램으로 gel 주위를 싸고 gel 크기와 동일한 3MM paper를 2 X SSC에 적셔 덮고 3MM 종이보다 조금 작게 흡수지를 만들어 올려놓았다. 이렇게 층을 만든 후 맨 위에 유리판을 얹고 500g의 무게로 누른 상태로 하룻밤 동안 방치하였다. 다음 날 흡수지와 3MM 종이를 제거하고 다른 건조한 3MM 종이위에 NC membrane를 올려놓고 볼펜으로 gel slot를 표시하였다. NC membrane를 6 X SSC에 5분 담그고 상온에서 30분간 말렸다. 3MM 종이 사이에 NC membrane를 넣고 80°C 건조기에서 2시간 동안 진공건조시킨 후 hybridization을 시행할 때까지 보관하였다. Gel 중의 RNA가 완전히 NC membrane으로 옮겨 갔는지 확인하기 위하여 위의 gel을 staining 용액(0.5 μ g/ml of ethidium bromide in 0.1N ammonium acetate)에 넣어 45분간 흔들어준 후 UV transilluminator로 gel 중의 RNA가 남아있는지의 여부를 관찰하였다.

7-4. cDNA labeling 및 분리

6-4항에서 얻은 cDNA는 Feinberg 및 Vogelstein(1983)의 방법을 이용한 randomprimed DNA labeling kit(Boehringer Mannheim, 독일)를 사용하여 다음과 같이 label하였다. 500 μ l 용량의 미소원침관에 변성시킨 25ng의 cDNA, 반응혼합액 2 μ l, 5 μ l의 [α -³²P]dCTP 그리고 klenow효소(2 units/ μ l) 1 μ l을 넣고 최종 용량이 20 μ l 되도록 재증류수로 채운 다음 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5M EDTA(pH 8.0) 1 μ l를 넣어 반응을 중지시켰다. 이 반응액을 Sephadex G-50이 채워져 있는 spun-column(0.5cm x 10cm)을 이용하여 gel filtration chromatography를 시행하여 label된 cDNA와 유리 [α -³²P]dCTP를 Sambrook등(1989)의 방법으로 다음과 같이 분리하였다.

1ml 용량의 1회용 주사기의 앞부분을 Whatman 종지와 실리콘 처리된 glass wool로 막

고, 상온에서 STE 용액(0.1 M NaCl, 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 미리 팽창시켜 높은 Sephadex G-50을 주사기에 넣어, 1,600 x g로 4분간 원침하였다. Gel의 부피가 0.9 ml될 때까지 Sephadex G-50을 반복 충전하였다. 마지막으로 100 μ l의 STE용액으로 column을 통과시켜 같은 양이 나오는지 확인하였다. 이렇게 준비한 column에 위와같이 반응시킨 cDNA 혼합액을 붓고 같은 속도로 원침해서 통과된 cDNA를 얻었다. Spun-column을 통과 시키기 전 후의 액 중에서 2 μ l씩 취해 β counter로 측정된 후 labeling 정도와 specific activity를 계산하였다.

7-5. Hybridization과 자가방사법

7-4항에한 준비한 NC membrane을 prehybridization 하기 전에 한 번 더 80 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 진공상태에서 건조시켰다. 이렇게 한 NC membrane을 42 $^{\circ}$ C의 prehybridization 용액 [50% formamide, 2 x SSC, 0.05M sodium phosphate 완충액 (pH 6.5), Denhardt'용액 (0.02% polyvinyl pyrrolidone (MW, 4000), 0.02% BSA, 0.02% Ficoll 400), 1% SDS, 100 μ g/ml heat denatured salmon sperm DNA]를 NC 면당 0.2ml를 비닐 bag에 넣고 봉합한 후 1시간 동안 42 $^{\circ}$ C로 유지된 수조관에 담구었다. Prehybridization이 끝난 후 비닐 bag의 한 모서리를 가위로 잘라서 prehybridization용액을 제거하였다. 여기에 7-4항에서 제조된 probe (1 x 10⁹ cpm/ μ g cDNA)를 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 즉시 얼음물에 담구었다. 이 probe가 포함된 prehybridization용액을 위의 비닐 bag에 넣고 봉합한 후 42 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 충분히 반응시켰다. Hybridization이 끝난 후 비닐 bag에서 NC membrane을 조심스럽게 꺼내어 200ml의 0.1% SDS가 포함된 2 x SSC 용액으로 10분씩 3회 세척하였다. 그 후 500ml의 0.1% SDS가 포함된 1 x SSC 용액으로 65 $^{\circ}$ C에서 15분마다 NC membrane을 뒤집어 주면서 45분 동안 세척하였다. NC membrane을 Whatman 3MM 종이 위에서 건조

시켜 랩으로 싨 후 intensifying screen이 붙은 X-ray film cassette에 넣고, 암실에서 X-Omat film을 얹고 -70 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 노출시킨 후 현상하였다.

8. Fibronectin 측정

8-1. 시료준비

24 well plate에 교원질 측정할 때와 같이 세포를 접종하고 육안적으로 밀생상태가 되면 배양액을 버리고 여러농도의 IFN- γ 를 새로운 배양액에 섞어 48시간 동안 노출시킨 후에 배양액을 회수하였다. 배양액을 미세원심관에 옮긴 후 RT6000(Sorvall, 미국) 원심분리기로 4 $^{\circ}$ C에서 1800rpm으로 5분간 원침한 뒤 상청액(800 μ l)을 취하여 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 같은 상청액에서 일부를 취하여 Lowry등(1951)의 방법으로 단백질량을 측정하여 fibronectin양을 μ g/mg of protein으로 표기하였다.

8-2. Fibronectin 측정

Fibronectin측정은 Rennard등(1980)의 방법을 이용하여 다음과 같이 시행하였다. Fibronectin은 사람의 혈장에서 Miekka등(1982)의 방법에 따라 gelatin sepharose 4B를 이용한 affinity chromatography법으로 분리하였다. 분리된 fibronectin을 희석액(20 mM carbonate 완충용액, pH 9.6, 0.02% sodium azide)으로 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 polystyrene plate의 각 well에 흡착시킨 후, PBST(20 mM sodium phosphate, 0.15M sodium chloride, 0.01% Tween 20, pH 7.2)용액으로 수회 세척하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. PBST 용액으로 희석한 항체용액과 시료를 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시킨 후 PBST용액으로 수회 세척하였다. PBST 용액으로 희석된 효소-항체 결합액을 첨가하고 90분간 실온에서 반응시켰다. 세척 후 효소기질액을 넣고 60분간 반응시킨 후 4N의 H₂SO₄ 50 μ l를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음 즉시 490nm에서 흡광도를 측정하

였다. 기질액은 O-phenylenediamine을 methanol에 10gm/ml의 농도로 녹인 다음 H₂O₂가 0.03% 함유된 재증류수로 100배 희석하여 사용직전에 만들어 사용하였다.

9. Alkaline phosphatase 활성도 측정

세포층의 alkaline phosphatase 활성도는 Bessay등(1946)과 Burch등(1982)의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 조건을 준 24well plate의 배양액을 제거한 후 찬 PBS로 3번 씻은 후 측정할 때까지 -20°C에 보관하였다. 얼음 위에서 기질(PNPP : Sodium par-nitrophenyl-2-phosphate)을 준비하고 세포층에 lysis 완충액(0.02% Nonident F-40)을 1ml 넣어 30초간 초음파 마쇄기로 마쇄한 다음 300 μl을 취하여 alkaline phosphatase의 활성도를 측정하였고 200 μl을 취하여 단백질의 양을 측정하였다. 표준용액으로는 par-nitrophenol을 30nmol까지 되도록 하여 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 1N의 NaOH 250 μl를 넣어 반응을 중단시켰다. 이것을 410 nm에서 spectrophotometer(Gilford, 미국)로 흡광도를 측정하여, alkaline phosphatase의 활성치는 U/min/mg protein 단위로 나타내었다.

IV. 성적

치주인대 세포의 DNA양과 합성능에 미치는 IFN-γ의 효과 IFN-γ는 치주인대 세포의 DNA 합성능을 대조군의 6475 ± 286 dpm/well에 비하여 10 U/ml 투여시 7374 ± 783 dpm/well로, 100 U/ml 투여시 8475 ± 340 dpm/well로 농도에 유관하게 증가시켰으나, 1000 U/ml에서는 8315 ± 368 dpm/well로 100 U/ml과 그 효과에서 차이가 없었다(Fig. 1). 한편 DNA 총량은 대조군의 4.18 ± 0.1 μg/well에서 10, 100 및 1000 U/ml에서 각각 4.33 ± 0.2, 4.35 ± 0.1 및 4.62 ± 0.1 μg/well로 각 농도의 IFN-γ에 의해 약간 증가하였으나 뚜

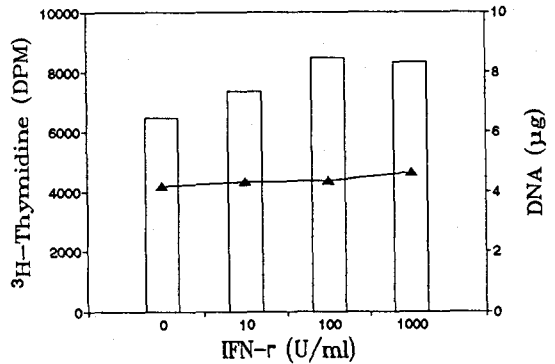


Fig. 1. Dose-dependent effect of IFN-γ on DNA synthetic activity and DNA contents in human periodontal ligament cells. Cells were seeded at 1 x 10⁵ cells/ml in DMEM containing 10% FBS. After 3 days, DMEM containing 50 μg/ml ascorbic acid, 1 μCi [³H]thymidine and the indicated amounts of IFN-γ were added. DNA synthetic activity (bar) and DNA contents (▲) were measured as Materials and Methods. Each value represents the average of six determinations.

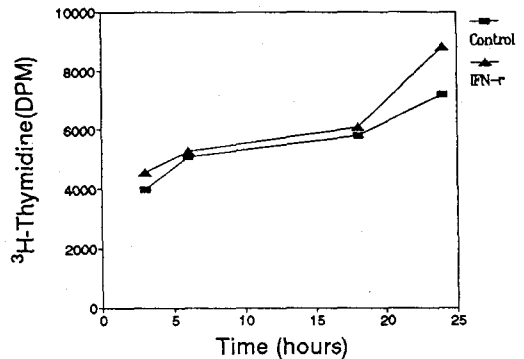


Fig. 2. Time-response effect of IFN-γ on [³H]thymidine incorporation rate by human periodontal ligament fibroblasts. Cells were seeded at 1 x 10⁵ cells/ml in DMEM containing 10% FBS. After 3 days, confluent cultures containing 1 μCi [³H]thymidine in DMEM were treated with IFN-γ (1000 U/ml) for various times. Each value represents the average of six determinations.

렷한 영향을 받지 않았다(Fig. 1). Fig. 2는 IFN-γ가 세포의 DNA 합성능에 영향을 미치기까지 소요되는 시간을 관찰하기 위해 1000 U/ml의 IFN-γ를 투여하고 지정된 시간만큼 세포를 배양하면서 [³H]thymidine의 편입량을 관찰한 결과, 3, 6 및 18 시간까지는 시

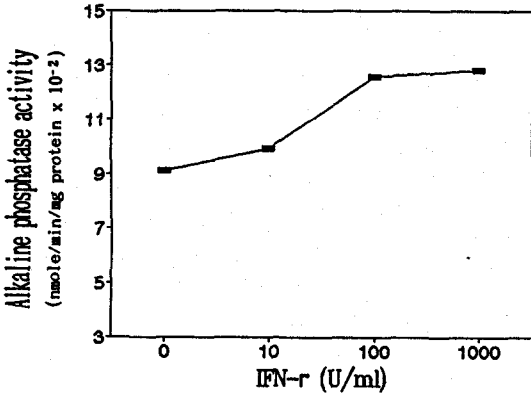


Fig. 3. Dose-dependent effect of IFN-γ on alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells. Confluent human periodontal ligament cells were incubated with IFN-γ at various concentrations for 24 h. After removal of medium, the cell layer was prepared as described under Materials and Methods. Data were expressed as mean for six determinations.

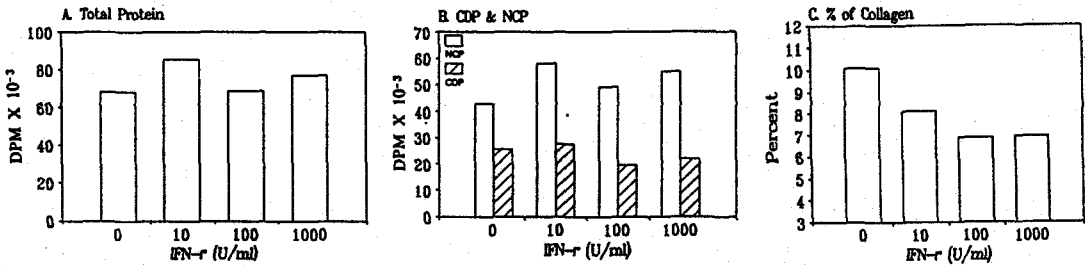


Fig. 4. Dose-dependent effect of IFN-γ on collagen and noncollagen protein production by human periodontal ligament cells. Confluent cultures containing 2 μCi/ml of [³H]proline and 50 μg/ml of ascorbic acid in the medium were treated with IFN-γ at various concentrations for 24 h. Data were expressed as mean for six determinations.

간별로 각각 대조군의 3985 ± 487, 5091 ± 678 및 5788 ± 1236 dpm/well에서 IFN-γ 투여군의 4458 ± 472, 5268 ± 676 및 6076 ± 663 dpm/well로 IFN-γ에 의해 합성능이 조금 증가하였으나 큰 효과는 나타나지 않았으며, 24시간이 경과한 후에는 대조군의 7196 ± 584 dpm/well에 비해 IFN-γ 투여군의 8813 ± 323 dpm/well로 IFN-γ가 DNA 합성능을 증가시키는 효과가 나타났다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성에 미치는 IFN-γ의 효과

ALP활성도는 대조군의 911.36 ± 38 nmole/min/mg에서 10, 100 및 1000 U/ml의 IFN-γ 투여시 각각 991.76 ± 79, 1256.2 ± 65 및 1284.26 ± 101 nmole/min/mg으로 활성이 증가되는

경향을 나타내었다(Fig. 3). 총 단백질량은 IFN-γ의 농도가 증가할수록 많아지는 경향을 나타내었다.

교원질 합성에 미치는 IFN-γ의 효과

Fig. 4에서 IFN-γ의 양에 따른 치주인대 세포의 총단백질 및 교원질 합성의 변화를 도시하였다. IFN-γ는 총단백질의 합성을 대조군의 68383 ± 4991 dpm/well에서 10, 100 및 1000 U/ml의 85385 ± 5789, 68557 ± 4085 및 76927 ± 4227 dpm/well로 농도에 따른 경향이 없이 증가시키는 효과를 나타내었다(Fig. 4, A). 총단백질을 교원질(collagenase digestible protein; CDP)과 비교원성 단백질(noncollagenous protein; NCP)로 분류하여 비교하였을 때 비교원성 단백질에는 대조군

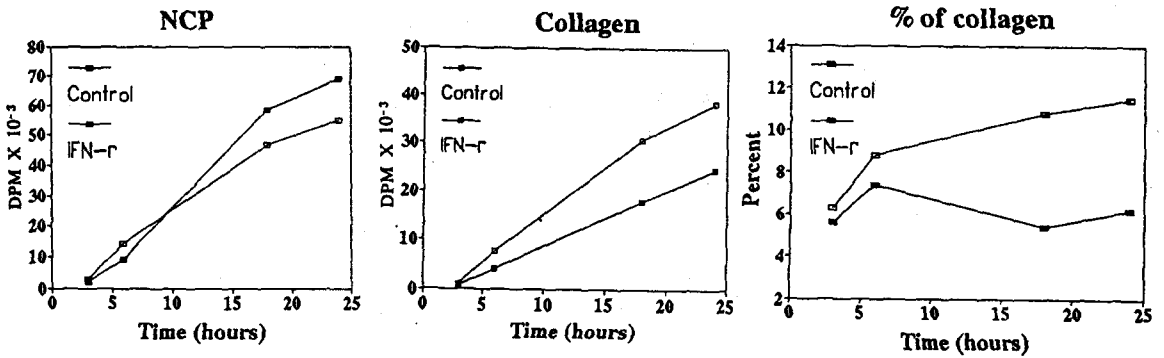


Fig. 5. Time-response effect of IFN- γ on collagen and noncollagen protein synthesis by human periodontal ligament cells. confluent cultures containing 2 μ Ci/ml of [³H]proline and 50 μ g/ml of ascorbic acid in the medium were treated with IFN- γ (100 U/ml) for various times. Data were expressed as mean for six determinations. Percent of collagen is the percentage of newly synthesized collagen relative to total protein.

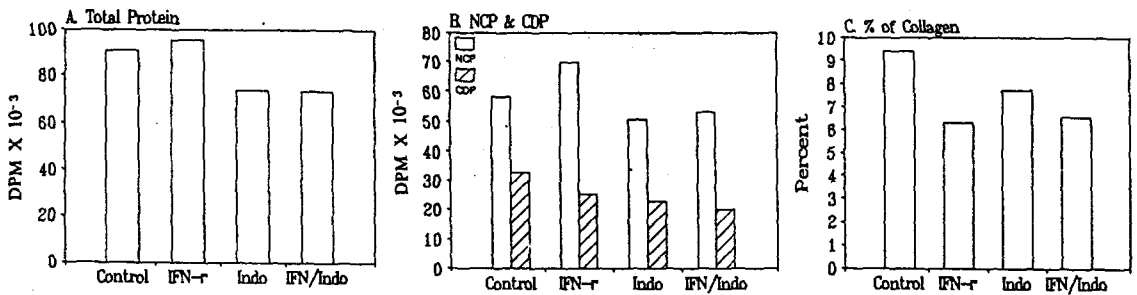


Fig. 6. Effect of indomethacin on IFN- γ induced inhibition of collagen production by periodontal ligament cells. Confluent cultures were treated with IFN- γ (5 μ g/ml, Indo) for 24 H. Data were expressed as mean for six determinations.

의 42842 ± 5369 dpm/well에서 10, 100 및 1000 U/ml에서 각각 58025 ± 6198 , 49119 ± 3478 및 54865 ± 3688 dpm/well로 합성을 자극하는 효과를 나타내었으나, 교원질의 합성은 대조군의 25541 ± 923 dpm/well에서 100 및 1000 U/ml의 19458 ± 518 및 22062 ± 801 dpm/well로 오히려 억제하는 효과를 나타내었다(Fig. 4, B). 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 대조군의 $10.1 \pm 1.4\%$ 에서 10 U/ml의 $8.1 \pm 1.2\%$ 그리고 100 및 1000 U/ml에서는 $6.9 \pm 0.3\%$ 로 감소하여, IFN- γ 는 교원질에 특이하게 합성을 억제하는 효과가 있음을 나타내었다(Fig. 4, C). 따라서 이 후의 실험에서의 IFN- γ 용량은 교원질 합성 억제 효과가 큰 1000 U/ml로 하였다.

Fig. 5는 IFN- γ 가 투여되고 교원질의 합성에 그 영향이 나타나기 까지 소요되는 시간을 도시한 것으로, IFN- γ 를 투여하고 각각 3, 6, 18 및 24시간 동안 NCP와 CDP의 변화를 관찰하였다. NCP는 IFN- γ 를 투여하고 실험 전 기간 동안 대조군과 뚜렷한 차이가 없었으나, 18 및 24시간 군에서는 각각 55616 ± 2813 , 68936 ± 3787 dpm/well로 대조군 46697 ± 3035 , 54900 ± 1673 dpm/well에 비해 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 5, A). CDP는 IFN- γ 투여 후 시간이 경과함에 따라 대조군 965 ± 84 , 7449 ± 373 , 30483 ± 775 및 38364 ± 1378 dpm/well에 비해 합성이 634 ± 153 , 3968 ± 544 , 17854 ± 1005 및 25237 ± 816 dpm/well로 억제되는 경향을 나타내었다(Fig. 5,

B). 총단백질에 대한 교원질의 비율도 18 및 24시간이 경과한 후 대조군에서 10.8 ± 0.5 , $11.5 \pm 0.5\%$ 에 비해 IFN- γ 를 투여한 군에서 5.4 ± 0.3 , $6.2 \pm 0.5\%$ 로 현저하게 감소되었다 (Fig. 5, C). 따라서 IFN- γ 를 가하고 최소한 18시간은 경과해야만 교원질 합성에 그 억제 효과가 뚜렷이 나타남을 알 수 있었고(Fig. 5, D), 이후 모든 실험에서는 IFN- γ 를 투여하고 24시간 후에 그 효과를 관찰하였다.

Fig. 6은 IFN- γ 가 교원질 합성을 특이하게 억제하는 과정에서 prostaglandins(PGs)이 중간과정에 매개되는지를 확인하기 위하여 PGs 합성에 관여하는 cyclooxygenase의 억제제인 indomethacin을 투여하여 교원질 합성을 측정 한 결과이다. Indomethacin은 총단백질의 합성에 있어서 대조군 90576 ± 4018 dpm/well에 비해 73760 ± 2638 dpm/well로 IFN- γ 의 동반투여(73408 ± 1747 dpm/well)와 관계없이 전반적으로 억제하는 경향을 나타내었다(Fig. 6. A). NCP와 CDP합성에 대해서 indomethacin은 IFN- γ 의 존재와 관계없이 양자를 동시에 억제하는 경향을 나타내었다(Fig. 6. B). 총단백질에 대한 교원질의 합성 비율을 살펴볼 때 indomethacin 단독으로는 대조군의 $9.4 \pm 0.7\%$ 에서 $8.6 \pm 0.6\%$ 로 교원질 합성을 억제하는 효과를 나타내었으나, IFN- γ 의 존재하에서는 IFN- γ 만 투여한 군의 $6.3 \pm 0.2\%$ 에서 IFN- γ 와 indomethacin을 동반 투여한 군의 $6.5 \pm 0.4\%$ 로 영향을 미치지 못하여, IFN- γ 에 의한 교원질 합성 억제과정에 PGs가 중간에 매개되지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 6. C).

Fibronectin 합성에 미치는 IFN- γ 의 효과

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 측정 한 치주인대 세포의 fibronectin 합성능에는 10 및 100 U/ml의 IFN- γ 는 유의한 영향을 미치지 않았다. 그러나 1000 U/ml의 농도에서는 대조군의 $3.25 \mu\text{g}/\text{mg}$ 에 비해 60% 정도 증가한 $5.21 \mu\text{g}/\text{mg}$ 증

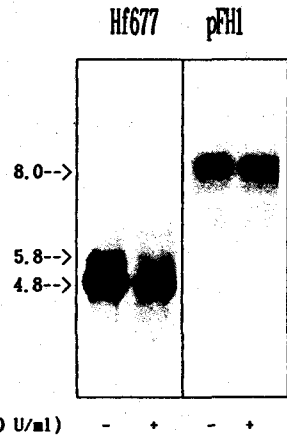


Fig. 7. Representativ autoradiograms for Northern blot of RNA form control and IFN- γ treated human periodontal ligament cells.

Confluent cells were treated with IFN- γ (1000 U/ml) for 24 h, and total RNA was extracted from the cells. For Northern blots, Total RNA(10 μg) was electrophoresed in a 1% agarose gel, transferred to nitrocellulose membrane, prehybridized, hybridized with specific ^{32}P -labeled cDNAs, and then exposed for autoradiography at -70°C as described under Materials and Methods. IFN- γ (1000 U/ml) results in a marked decrease in type I procollagen mRNA(Hf677), while showing no significant change in fibronectin mRNA(pFH1).

Table. 1. Effects of IFN- γ on fibronectin production by human periodontal ligament cells

IFN- γ (U/ml)	Fibronectin ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein)	Total Protein ($\mu\text{g}/\text{well}$)
0	3.25 ± 0.22	953.4 ± 13.6
10	3.80 ± 0.39	910.1 ± 12.9
100	3.45 ± 0.37	879.3 ± 18.6
1000	5.21 ± 0.52^a	914.0 ± 11.1

Confluent cultures were treated with IFN- γ at various concentrations for 48 h. Fibronectin amounts were measured in medium by ELISA and were expressed as mean \pm SD for six determinations.

^a: $p < 0.01$, compared to control value

가시키는 양상을 나타내었다(Table 1). 그러나 같은 시료에서 측정 한 총단백질의 양은 IFN- γ 에 의해 뚜렷하게 변화하는 양상은 나타나지 않았다.

교원질 및 fibronectin mRNA의 steady state 양에 미치는 IFN- γ 의 효과

Fig. 7은 IFN- γ 가 mRNA의 양에 미치는 효과를 볼 수 있는 autoradiogram으로 교원질의 mRNA(Hf677)는 전기영동 상에서 4.8 kb와 5.8 kb위치에 나타났으며, 대조군에 비해 현저히 감소하였으나, fibronectin mRNA(pFH 1)는 8.0kb 위치에 나타났으며, 그 양에 있어서는 대조군과 차이를 나타내지 않았다.

V. 고찰

교정력에 의한 치아의 이동은 치주인대 세포를 매개로 골조직의 개조가 일어나는 과정으로, 현재까지 물리적인 힘이 어떻게 전달되어 골 개조라는 결과로 나타나는지에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않으며, 이러한 골 개조 과정의 정확한 이해는 교정치료의 수준을 한단계 높혀 줄 수 있는 도약대로 여겨지고 있다. 골 개조 과정은 골형성 과정과 골흡수의 두 단계로 나누어 볼 수 있으며, 골형성 과정은 골기질의 합성 및 석회화 단계로, 골흡수 과정은 탈회 및 유기 골기질의 분해로 나누어 볼 수 있겠다. 이러한 과정들은 세포에 의해 정확하게 조절되며, 이 세포들의 조절은 이미 언급한 바와 같이 호르몬 등의 전신적 인자와 cytokine 같은 국소적 인자에 의해 이루어지고 있다(Raisz, 1988 ; Krane 등, 1988). 최근 급속한 발전을 보이고 있는 세포생물학과 분자생물학의 지식을 통하여 골 개조의 조절은 이들 여러 인자들이 골 개조를 담당하는 세포의 유전자 발현을 조절함으로써 이루어지고 있다는 것을 이해하게 되었으며, 이 연구에서는 치조골의 재형성에 중심적 역할을 하는 것으로 알려진 치주인대 세포에서 골기질의 주성분이며, 골세포로의 성장분화단계 초기에 발현된다고(Stein 등, 1990) 알려진 교원질과 fibronectin의 유전자의 발현에 미치는 IFN- γ 의 효과를 관찰하여, 골재형성 과정 중에서도 특히 유기 골기질의

합성과정을 중심으로 관찰하였다.

Interferons은 많은 세포들에 대하여 성장 억제 효과를 가진 것으로 알려져 있는데, Ebsworth 등(1984)은 mouse Swiss 3T3 세포에서 IFN- γ 는 DNA합성을 억제하며 그 효과가 cAMP를 통해 일어나는 것은 아니라고 하였으며, Jabbar 등(1989)은 사람 폐암세포에서 IFN- γ 의 세포성장 억제효과를 확인한 바 있고, Oleszak(1988)는 사람 섬유아세포에 대한 PDGF, EGF 및 FGF의 성장 촉진효과가 IFN- γ 에 의해 차단된다고 하였다. 또한 Estervig 등(1989)은 IFN- γ 는 세포증식을 억제하면서 세포의 분화를 유발하는 효과가 있다고 하였으며, Hosang(1988)은 사람 피부 섬유아세포에 대한 PDGF의 성장 촉진효과가 IFN- γ 에 의해 차단됨을 보고한 바 있다. IFN- γ 에 의한 세포 증식억제 효과의 기전은 cell cycle 과정에서 G₁에서 S phase로의 이행을 억제함으로써 나타나며(Balkwill과 bokhon'Ko, 1984), 이러한 이행의 억제는 다른 성장인자에 의한 c-myc과 c-fos의 유전자 발현을 IFN- γ 가 억제하는 것과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다(Vilcek 등, 1987 ; Zullo 등, 1985).

반면 Brinckerhoff와 Guyre(1985)는 사람의 활막 섬유아세포에 대하여 IFN- γ 는 세포증식을 오히려 촉진한다고 하여 IFN- γ 를 성장 촉진 인자로 보고한 바 있다. 그러나 현재까지 대부분의 연구에서는 거의 모든 종류의 세포에 대하여 IFN- γ 는 세포증식 억제효과가 있음이 보고되어 있으며, 여러 interferons중에서도 특히 IFN- γ 는 α 혹은 β 형에 비해 세포에 대한 성장억제 효과가 더 크고(DeMaeyer와 Demaeyer-Guignard, 1988), 상기의 연조직 세포 뿐 아니라 골세포에 대해서도 성장억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. Nanes 등(1989)은 IFN- γ 는 쥐의 골육종세포에서 [³H]thymidine 편입속도를 둔화시키는, 즉, 성장을 억제하는 능력이 있으며, 24시간에서 그 최대 억제능력을 나타낸 후 약 5일간 그 낮은 상태를 유지한다고 하였다. 또한 이러한 상태에서도 세포는 증식만 억

제될 뿐이지 소수의 안정된 세포교체는 이루어지고 있었으며, 세포에 독성을 나타내지는 않는다고 하였다. Bresford 등(1990)도 정상인의 골세포와 골육종세포에서 interferon들의 세포성장 억제효과를 관찰하여 정상 골세포에서 IFN- γ 는 5 U/ml 이상의 용량에서 96시간 배양으로 세포의 DNA양을 1/2 전도로 격감시켰다고 보고하였다. 이 실험에서는 치주인대 세포를 사용하였던 바, Somerman 등(1988), Maeder 등(1988), Piche 등(1989) 그리고 Nojima 등(1990)은 치주인대 세포가 골세포의 성상을 많이 나타내고 있다고 한 바 있으며, 이 실험에서 사용한 치주인대 세포도 골세포적인 성상을 나타낸다고 보고된 바 있다(Suh 등, 1991). 그러나 이 실험에서 사용된 치주인대 세포는 이미 보고된 골세포에서의 성장에 미치는 항증식 효과와는 달리 IFN- γ 에 의하여 [3 H]thymidine 편입속도가 오히려 증가되었으며, 세포내 DNA 총량에는 거의 영향을 미치지 않았다. 세포의 종류가 다르면 어떤 약제나 물질이 세포 성장에 미치는 영향도 차이가 있게 마련이며, 현재까지는 치주인대 세포에 IFN- γ 를 투여한 후 성장을 측정할 논문은 없었기에 결론적인 언급은 할 수 없으나, 치주인대 세포는 섬유아세포나 골세포와는 또 다른 특성을 가지고 있는 것으로 판단되며 앞으로 더 연구해 볼 가치가 있을 것으로 생각된다.

Alkaline phosphatase의 활성은 type I 교원질과 osteocalcin 유전자의 높은 발현과 함께 골세포의 표식 인자로 알려져 있고(Stein 등, 1990), 이 실험에 사용된 치주인대 세포도 10일 이상 오래 배양한 경우 ALP의 활성이 높아져서, 골세포의 특성을 일부 나타내고 있다고 보고된 바(Suh 등, 1991) 있다. IFN- γ 가 이 세포의 골세포로의 분화에 미치는 영향을 파악하기 위하여 ALP 활성을 측정해 본 결과, 효소활성을 증가시키는 시켰으나 Suh 등(1991)이 보고한 석회화가 일어날 정도의 효소활성 증가는 보이지 못한 것으로 나타났다.

일반적으로 어떤 단백질의 유전자 발현은

그 과정 중 여러부분에서 조절받을 수 있는데, 그 단백질의 유전자로 부터 mRNA로의 전사 과정, 전사된 mRNA의 변형과정, 완성된 mRNA의 핵으로 부터 세포질로의 이송과정, 그리고 세포질로 이송된 mRNA의 안정성 등에서 조절받을 수 있으며(Nevins, 1983), 상기 모든 과정에서의 조절효과는 세포내 특정 mRNA 양으로 판단할 수 있다. 또한 상기 언급한 과정 뿐만 아니라 mRNA로 부터 단백질을 생합성하는 과정에서도 여러 단계에 걸쳐 조절을 받을 수 있으며, 이 모든 효과는 합성된 단백질의 양으로 판단할 수 있겠다. 이 실험에서는 골 기질의 주성분인 교원질과 당단백질의 일종인 fibronectin의 유전자 발현에 미치는 IFN- γ 의 효과에 대하여 살펴보았는데, 현재까지 IFN- γ 가 여러세포에서 두 단백질의 유전자 발현에 미친 영향을 고찰해보면, Rosenblomm 등(1984)은 교원질 합성에 미치는 IFN- γ 의 효과를 사람의 섬유아세포를 사용하여 관찰하였던 바 교원질의 합성은 억제되었다고 하였으며, 이러한 합성억제는 교원질 mRNA의 양적 감소와 연관되어 있다고 하였다. 또한 이러한 결과로서 교원질 유전자 발현의 조절은 mRNA로의 전사과정에서 주로 이루어질 것으로 생각하였다. Stephenson 등(1985) 그리고 Amento 등(1985)은 rheumatoid 활막세포에서 IFN- γ 는 pro α_1 (I) collagen 및 pro α (III) collagen mRNA의 양을 감소시키는 효과가 있음을 보고하였고, Czaja 등(1987)은 사람 피부 섬유아세포에서 IFN- γ 가 교원질의 유전자 발현을 억제하였으나, fibronectin의 유전자 발현은 오히려 증가시키는 상이한 효과를 나타내었다고 하였으며, 이들 유전 발현은 조절하는 기전도 상이하다고 하였으며, Kahari 등(1990)도 DNA transfection assay를 통한 연구에서 IFN- γ 에 의한 교원질의 합성은 유전자 전사단계 이후에서 조절 받을 것임을 주장하였다. 또 Scharffetter 등(1989) 그리고 Granstein 등(1989)도 사람 피부 섬유아세포에서 IFN- γ 가 섬유화 억제 효과가 있음을 보고하였다. Narayanan 등

(1989)은 사람의 치은 섬유아세포 대하여서도 IFN- γ 는 교원질 합성을 억제하는 효과를 보였는데, 이 때도 교원질 mRNA양이 단백질이 억제되는 것과 유의한 상관관계를 보인 까닭에 IFN- γ 가 교원질 합성을 조절하는 부위는 유전자로 부터의 전사단계 및 전사 후 변형(posttranscriptional modification)과정일 것으로 생각되며, translation이나 그 이후 과정은 큰 역할을 하지 못할 것으로 생각하였다.

한편 Nanes 등(1989)은 쥐의 골육종세포에서 IFN- γ 는 골기질의 근간이 되는 교원질의 합성을 억제하는 것을 관찰한 바 있으며, Bresford 등(1990)도 사람의 골육종세포와 정상 골세포에서 IFN- γ 의 교원질 합성 억제능을 관찰하였고, Goldring 등(1986)은 관절부 연골세포와 흉골부 연골세포에서 IFN- γ 에 의해 type II collagen의 유전자 발현이 억제되는 것을 관찰하여, 연조직 세포 뿐만 아니라 골세포나 연골세포 및 이들의 암세포에서도 IFN- γ 는 교원질 합성능을 억제한다고 보고되어 있다. 이 실험에 사용된 치주인대 세포에서도 IFN- γ 는 교원질 mRNA 양을 감소시켰으며, 교원질 합성단계에서도 이와 비슷한 정도의 억제효과를 보였다. 또한 Narayanan 등(1989)이 주장한 바, 교원질의 번역(translation) 이전 과정, 그리고 Czaja 등(1987)이 주장한 전사과정 이후에서 IFN- γ 에 의해 조절받을 것으로 생각할 수 있겠다. 그리고 Saito 등(1989)은 primary culture한 사람의 치주인대 세포를 배양할 때 IFN- γ 를 배양액에 첨가한 경우 배양액으로 유리되는 PGE의 양이 IFN- γ 를 가하고 1시간 후 부터 유의한 증가를 나타내었고, 24시간 경과할 때까지 그 증가가 유지됨을 보고하였다. 또한 같은 조건에서 indomethacin의 투여로 PGE의 합성이 완전히 차단됨을 보고한 바 있다. 이를 근거로 이 실험에서는 IFN- γ 에 의해 생성된 PGE가 IFN- γ 의 교원질 합성 억제과정에 개입되어 있는지의 여부를 파악하기 위하여 PGE 생성 억제제인 indomethacin을 IFN- γ 와 동시에 투여해본 결과, PGE는 IFN- γ 에 의한 교원질

합성 억제과정에 매개되지 않았음을 확인할 수 있었다.

한편 fibronectin의 유전자 발현은 교원질과 다른 기전으로 조절될 것으로 생각되어 지고 있으며, 실제 fibronectin 합성에 미치는 IFN- γ 의 효과는 세포마다 차이는 있지만 교원질의 합성에 미치는 효과와는 상이한 것으로 보고되어 있다. Czaja 등(1987)은 IFN- γ 가 fibronectin의 mRNA 양을 증가시켰으나, nuclear run-on assay를 통하여 유전자의 전사속도에는 차이가 없었음을 보고한 바 있다. 반면 Jo 등(1991)은 정상인의 피부 섬유아세포에서 IFN- γ 는 fibronectin의 유전자 발현을 단백질 단계 및 mRNA 단계에서 영향을 미치지 않았다고 하였으며, Amento 등(1985) 그리고 Stephenson 등(1985)은 keratinocyte에서 각각 IFN- γ 에 의해 fibronectin 합성이 억제됨을 보고한 바 있다. 이 실험에서는 1000 U/ml의 고농도에서만 fibronectin의 양이 증가하였으나, 같은 농도에서 mRNA의 양적변화는 없었다. 즉 mRNA로 부터 fibronectin을 합성해내는 번역과정에서의 조절에 IFN- γ 가 영향을 미쳤을 것으로 생각할 수 있겠다. 이처럼 교원질과 fibronectin 유전자 발현의 조절이 상이하게 나타나는 까닭은 아직까지 확실하게 밝혀진 바가 없다. 그러나 Jefferson 등(1985), Cockayne 등(1986) 그리고 Weiner 등(1987)은 dexamethasone의 투여로 교원질의 유전자 발현은 억제되었다고 하였으며, 반대로 Oliver 등(1983)은 dexamethasone에 의해 fibronectin의 유전자 발현은 촉진되었다고 하여 이 두 단백질의 발현 조절 기작이 상이함을 추측할 수 있으며, Czaja 등(1987)도 사람 피부 섬유아세포에서 IFN- γ 에 의해 교원질의 유전자 발현은 억제되고 fibronectin의 유전자 발현은 촉진되는 결과를 보고하였다. 이 실험에서도 교원질은 mRNA 및 단백질 합성단계에서 각각 억제됨을 보였으며, fibronectin은 mRNA는 변화가 없었으나 단백질 합성단계에서 증가함을 보여 부분적으로 Czaja 등(1987)의 결과와 일치하였다. 또한 DNA

합성 단계에서 IFN- γ 가 감소하거나, 독작용을 나타내지 않은 것으로 미루어 볼 때 교원질 합성의 감소가 세포 수의 감소때문은 아니라는 것을 알 수 있었다. 따라서 결론적으로 IFN- γ 는 치주인대 세포로부터 골기질의 주성분인 type I 교원질의 합성을 억제하는 효과를 보임으로써 이 세포가 존재하는 주변조직인 치조골을 안정화하는 효과가 있음이 나타났으며, 골조직의 개조를 억제할 필요가 있는 것에 사용할 수 있는 가능성을 보였다고 할 수 있겠다. 그리고 생체실험에 IFN- γ 를 적용해 보기 위해서는 이를 투여한 후 더 오랜기간 동안의 세포반응을 관찰할 필요가 있다고 생각되며, IFN- γ 의 작용 기전과 관련해서도 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 요약

결합 조직의 대사를 억제하고, 골조직이나 골세포의 골기질 대사 역시 억제하는 것으로 알려져 있는 Interferon- γ (IFN- γ)의 교정치료에의 이용 가능성을 평가하기 위하여, 교정력에 의한 골개조 과정에서 중심적 역할을 하는 것으로 알려진 치주인대 세포를 primary culture하여 배양된 세포에 IFN- γ 를 투여함으로써 이것이 골조직 기질의 합성능에 미치는 영향에 대하여 관찰하였다.

IFN- γ 는 세포의 DNA합성능을 약하게 증가시켰으며, 세포내 DNA 총량에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 이 실험에서 사용한 용량의 IFN- γ 는 세포에 독성이 없다고 할 수 있으며, 다른 결합조직 세포에서 나타나는 항증식 효과와는 반대되는 결과였다. IFN- γ 는 비교원성 단백질(NCP)의 합성을 증가시키는 양상을 나타내었으나, 교원질(CDP)의 합성은 감소시키는 경향을 보여, 총단백질에 대한 교원질의 합성비율은 IFN- γ 에 의해 용량 의존적으로 감소하였다. 또한 교원질의 mRNA양은 단백질 합성과 유관하게 IFN- γ 에 의해 억제되었다. 따라서 IFN- γ 는 교원질

합성의 전사과정 혹은 그 이후의 과정에 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있다. 한편 Indomethacin의 투여로 IFN- γ 에 의해 억제된 교원질의 합성이 영향을 받지 않았기 때문에 IFN- γ 에 의한 교원질 합성 과정에 prostaglandin이 관련되지 않았음을 알 수 있었다. 반면 fibronectin의 합성은 10 및 100 U/ml의 IFN- γ 투여시에는 영향을 받지 않았으나, 1000 U/ml의 IFN- γ 투여시에는 유의한 증가를 나타내어, 교원질에서와는 다른 영향을 나타내었다. 또한 mRNA steady state level에서도 IFN- γ 는 교원질의에서와는 달리 fibronectin mRNA 양에는 영향을 미치지 않았다. 즉 IFN- γ 가 fibronectin 유전자 발현에 영향을 미치는 부위는 전사나, 전사후 변형단계가 아닌 단백질 합성단계에서 영향을 미침을 보여주었다. 따라서 IFN- γ 가 교원질과 fibronectin 합성 조절 영향을 미치는 부위가 서로 다를 수 있겠다. Alkaline phosphatase의 활성은 10-1000 U/ml의 IFN- γ 를 투여시 약하게 증가시키는 경향을 보였으나 석회화가 일어날 정도로 높게 증가시키지는 못했다. 따라서 IFN- γ 는 골기질의 주성분인 type I 교원질의 합성을 선택적으로 억제하는 기능과 alkaline phosphatase의 활성을 크게 증가시키지 못한 점 등으로 미루어 볼 때, 골개조를 억제하는 방향으로 작용한다고 볼 수 있으며, 교정치료 과정중 골개조를 억제하는 부위에서 사용을 시도해 볼 수 있겠다.

Reference

1. Abbas, A., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.(1991) Cytokines, In, Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 225~243.
2. Amento, E. P., Bahn, a. T., McCullagh, K. G. and Krane, S. M.(1985) Influence of gamma interferon on synovial fibroblast-like cells. J. Clin. Invest. 76, 837~848.
3. Ausubel, f. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. O., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.(1987) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York, p. 4~9.
4. Balkwill, F. R. and Bokhon'Ko, A. I.(1984) Differential effe-

- cts of pure human α and γ interferon on fibroblast cell growth and proliferation. *Exp. Cell Res.*, 155, 190~197.
5. Bessay, O. A., Lowry, O. H., Brock, M. J.(1946) A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with fiber cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164, 321~329.
 6. Birnboim, H. C. and Doly, J.(1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513~1523.
 7. Bresford, J. N., Taylor, G. T. and Triffitt, J. T.(1990) Interferons and bone. *Eur. J. Biochem.*, 193, 589~597.
 8. Brinckerhoff, C. E. and Guyre, P. M.(1985) Increased proliferation of human synovial fibroblasts treated with recombinant immune interferon. *J. Immunol* 134, 3142~3146.
 9. Burch, W. M. and Levovitz, H. E.(1982) *in vitro* stimulation of alkaline phosphatase activity in immature embryonic chick pelvic cartilage by adenosine 3', 5'-monophosphate. *J. Cell Biol.*, 93, 338~342.
 10. Chambers, T. J.(1988) Resorption of bone, in, *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption*, edited by Davidovich, Z., pp. 93~100.
 11. Chambers, T. J., McSheehy, P. M. J. and Thomson, B. M.(1985) The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinol.*, 119, 1654~1659.
 12. Chomzynski, P. and Sacchi, N.(1987) Single-step method of DNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. biochem.*, 162, 156~159.
 13. Chu, M. L., Myers, J. C., Bernard, M. P., Ding, J. F. and Ramirez, I.(1982) Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human $\alpha 1(I)$ collagen chain. *Nucleic Acid Res.*, 10, 5925~5934.
 14. Chumbley, A. B. and Tuncay, O. C.(1986) The effect of indomethacin on the rate of orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.*, 89, 312~314.
 15. Cockayne, D., Sterling, Jr., K. M., Shull, S., Mintz, K. P., Illeyne, S. and Cutroneo, K. R.(1986) Glucocorticoids decrease the synthesis of type I procollagen mRNAs. *Biochem.*, 25, 3202~3209.
 16. Collins, M. K. and Sinclair, P. M.(1988) the local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod. dentofac. Orthop.*, 94, 278~284.
 17. Czaja, M. J., Weiner, F. R., Eghbali, M., Giambrone, M. A., Eghbali, M. and Zern, M. A.(1987) Differential effects of γ -interferon on collagen and fibronectin gene expression. *J. Biol. Chem.*, 262, 13348~13351.
 18. Czaja, M. J., Weiner, F. R., Takahashi, S., Giambrone, M. A., van der Meide, P., Schellekens, H., Biempica, L. and Zern, M. A.(1989) γ -interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology*, 5, 795~800.
 19. Davidovitch, Z., Nicolay, O., Ngan, P. W. and Shanfeld, J.(1988) neurotransmitter, cytokines and the control of the alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent. Clin. N. Am.*, 32, 411~435.
 20. Demaeyer, E. and Demaeyer-Guignard, J.(1988) Interferons and other regulatory cytokines, Wiley and Sons, New York, pp. 1~4.
 21. Derdak, S., Penny, D., Keng, P., Paxhia, A., Felch, M., Brown, D. and Phipps, R.(1989) Collagen production by subpopulation of lung fibroblasts: Differential inhibition by gamma-interferon. *Am Rev. Resp. Dis.*, 139, A205.
 22. Duncan, M. R. and Berman, B.(1985) γ -Interferon is the lymphokine and β -interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *J. Exp. Med.*, 162, 516~527.
 23. Ebsworth, N. M., Taylor-Papadimitriou, J. and Rozengurt, E.(1984) Cyclic AMP does not mediate inhibition of DNA synthesis by interferon in mouse Swiss 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, 120, 146~150.
 24. Estervig, D., Maercklein, P. B. and Scott, R. E.(1989) Resistance to neoplastic transformation induced by non-terminal differentiation. *Cancer Res*, 49, 1008~1013.
 25. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.(1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132, 6~13
 26. Goldring, M. B., Sandell, L. J., Stephenson, M. L. and Krane, S. M.(1986) Immune interferon suppresses levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in cultured human articular and costal chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, 261, 9049~9056.
 27. Gowen, M. and Mundy, G. Y.(1986) Actions of Recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon- γ on bone resorption *in vitro*. *J. Immunol.*, 136, 2478~2482.
 28. Granstein, R. D., Deak, M. R., Jacques, S. L., Margolis, R. J., Flotte, T. J., Shitaker, D., Long, F. H. and Amento, E. P.(1989) The systemic administration of γ -interferon inhibits collagen synthesis and acute inflammation in a murine skin wounding model. *J. Invest. Dermatol.* 93, 18~27.
 29. Granstein, R. D., Murphy, G. F., Margolis, R. J., Byrne, M. H. and Amento, E. P.(1987) Gamma-interferon inhibits collagen synthesis *in vivo* in the mouse. *J. Clin. invest.*, 79, 1254~1258.

30. Gresser, I.(1990) Biologic effects of interferons. *J. Invest. Dermatol.*, 95, 66S-71S.
31. Hosang, M.(1988) Recombinant interferon- γ inhibits the mitogenic effect of platelet-derived growth factor at a level distal to the growth factor receptor. *J. Cell. Physiol.*, 134, 396~404.
32. Jabbar, S. A. B., Twentyman, P. R. and Watson, J. V.(1989) The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. *Br. J. Cancer*, 60, 523~528.
33. Jefferson, D. M., Reid, L. M., Giambone, M-A., Shafritz, D. A. and Zern, M. A.(1985) Effects of dexamethasone on albumin and collagen gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Hepatology*, 5, 14~20.
34. Jo, J. S., Cho, Y. S., Choi, J. Y. and Kim, I. S.(1991) Interferons and phorbol myristate acetate independently suppress collagen gene expression in human dermal fibroblasts. *Kor. J. Biochem.*, 23, in press.
35. Kornblihtt, A. R., Vibe-Pedersen, A. and Baralle, F. E. (1983) Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 3218~3222.
36. Krane, S. M., Goldring, M. B. and Goldring, S. R.(1988) Cytokines. *Ciba Foundation Symposium*, 136, 239~256.
37. Kähäri, V-M., Chen, Y. Q., Su, M. W., Ramirez, f. and Uitto, J.(1990) Tumor necrosis factor- α and interferon- γ suppress the activation of human type I collagen gene expression by transforming growth factor- β 1. *J. Clin. Invest.*, 86, 1489~1495.
38. Labarca, C. and Paigen, K.(1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. biochem.*, 102, 344~352.
39. Lee, W.(1990) Experimental study of the effect of prostaglandin administration on tooth movement. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 98, 231~241.
40. Lerner, U. H., Ransjö, M., Ljunggren, O., Klaushofer, K., Hoffmann, O. and Peterlik, M.(1991) On the role of cDNA as a mediator of bone resorption. *J. Bone Mineral Res.*, 6: 551~560.
41. Lowry, O. B., Rosenbrough, M. J., Farr, A. L. and Rebar, R. W.(1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 255~260.
42. Maeder, C. L., Carnes, D. L. and Graves, D. T.(1988) Alkaline phosphatase and osteocalcin levels in cells from periodontal explants. *J. Dent. Res.*, 67, 232.
43. Miekka, S. I., Ingham, K. C. and Menache, D.(1982) Rapid methods for isolation of human plasma fibronectin. *Thromb. Res.*, 27, 1~14.
44. Mohammed, A. H., Tatakis, D. N. and Dziak, R.(1989) Leukotrienes in orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 95, 231~237.
45. Mostafa, Y. A., Weeks-Dybvig, M. and Osdoby, P.(1983) Orchestration of tooth movement. *Am. J. Orthod.*, 83, 245~250.
46. Nanes, M. S., McKoy, W. M. and Marx, S. J.(1989) Inhibitory effects of tumor necrosis factor- α and interferon - γ on DNA and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells. *Endocrinol.*, 124, 339~345.
47. Nanes, M. S., Rubin, J., Titus, L., Hendy, G. N. and Catherwood, B. D.(1990) Interferon - γ inhibits 1, 25 -dihydroxyvitamin D₃ -stimulated synthesis of bone Gla protein in ROS cells by pretranslational mechanism. *Endocrinol.*, 127, 588~594.
48. Narayanan, A. S., Page, R. c. and Swanson, J.(1989) Collagen synthesis by human fibroblasts. *Biochem. J.*, 260, 463~469.
49. Nevins, J. R.(1983) the pathway of eukaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 441-466.
50. Ngan, P. W., Shanfeld, J. and Davidovitch, Z.(1987) Immunohistochemical assessment of mRNA levels in periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.*, 66, 357.
51. Nickoloff, B. J., Mitra, R. S., Riser, B. L., Dixit, V. M. and Varani, J.(1988) Correlation with production of extracellular matrix molecules in response to growth promoting and antiproliferative factors. *Am. J. Pathol.*, 132, 127~135.
52. Nojima, N., Kobayashi, M., Shionome, M., Takahashi, N., Suda, T. and Hasegawa, K.(1990) Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J. Periodont. Res.*, 25, 179~185.
53. Oleszak, E.(1988) Inhibition of mitogenic activity of PDGF, EGF, and FGF by interferon- γ . *Exp. Cell Res.*, 179, 575~583.
54. Oliver, N., Newby, R. F., Furcht, L. T. and Bourgeois, S.(1983) *Cell*, 33, 287~296.
55. Peterkofsky, B. and Diegelmann, R.(1971) Use of a mixture of proteinasefree collagenases for the specific assay for radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry*, 10, 988~994.
56. Peterkofsky, b. and Prather, W. B.(1974) Increased collagen synthesis in Kirsten sarcoma virus transformed BALB 3T3 cells grown in the presence of dibutyl cyclic AMP. *Cell*, 3, 291~299.
57. Piche, J. E., Carnes Jr., D. L. and Graves, D. T.(1989) Initial characterization of cells derived from human periodontium. *J. Dent. Res.*, 68, 761~767.
58. Raisz, R. Z.(1988) Hormonal regulation of bone growth and remodelling. *Ciba Foundation Symposium*, 136, 226~

- 238.
59. Reitan, K.(1959) Tissue rearrangement during retention of orthodontically rotated teeth. *Angle Orthod.*, 29, 105~113.
 60. Rennard, S. I., Berg, R., Martin, G. R., Foidart, J. M. and Gehron, R. P.(1980) ELISA for connective tissue components, *Anal. Biochem.*, 104, 205~214.
 61. Roberts, W. E., Goodwin, W. C. and Heiner, S. R.(1981) Cellular response to orthodontic force. *Dent. Clin. of North Am.*, 25, 3~17.
 62. Rosenbloom, J., Feldman, G., Freundlich, B. and Jimenez, S. A.(1984) Transcriptional control of human diploid fibroblast collagen synthesis by γ -interferon. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 123, 365~372.
 63. Rygh, P.(1986) Periodontal response to tooth-moving force, In, *Orthodontics : State of the art essence of science.* edited by Graber, L. W., Mosby, St. Louis, Toronto, London, pp. 10~115.
 64. Saito, M., Ngan, P., Saito, S., shanfeld, J. and Davidovitch, z.(1989) Effect of interferon γ on PGE synthesis by cultured PDL fibroblasts. *J. Dent. Res.*, 68, 362 abstract
 65. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.(1989) (*Molecular cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, P7.
 66. Scharffetter, K., Hechmann, M., Hatamochi, A., Mauch, C., Stein, B., Riethmüller, G., Ziegler-Heitbrock, H. W. L. and Krieg, T.(1989) Synergistic effect of tumor necrosis factor α and interferon γ on collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro. *Experim. Cell Res.*, 181, 409~419.
 67. Shapiro, S. D., Campbell, E. J. and Welgus, H. G.(1989) Gamma-interferon selectively suppresses metalloproteinase production by human macrophages and fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 111, 14a.
 68. Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm, G. R. and Foster, R. A.(1988) A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.*, 67, 66~70.
 69. Stashenko, P. S., Obernesser, M. S. and Dewhirst, F. E. (1989) Effect of immune cytokines on bone. *Immunol. Invest.*, 18, 239~249.
 70. Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A.(1990) Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.*, 4, 82~94.
 71. Stephenson, M. L., Krane, S. M., Amento, E. P., McCroskery, P. A. and Byren, M.(1985) Immune interferon inhibits collagen synthesis by rheumatoid synovial cells associated with decreased levels of the procollagen mRNAs. *FEBS lett.* 180, 43~50.
 72. Stolpen, A. H., Guinan, E. C., Fiers, W. and Pober, J. S. (1986) Recombinant tumor necrosis fractor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascula endothelial cell monolayers. *Am. J. Pathol.*, 123, 16~24.
 73. Suh, J. Y., Choi, J. Y., Ryoo, H. M., Park, J. B. and Jo, J. S(1990) Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Kor. J. Oral Biol.*, 15, 14 \pm 27.
 74. Vilcek, J., Kohase, M. and Henriksen-DeStefano, D.(1987) Mitogenic effect of double-stranded RNA in human fibroblasts : Role of autogenous interferon. *J. Cell Physiol.*, 130, 37~43.
 75. Watrous, D. A. and Adndrew, B. S.(1989) the metabolism and immunology of bone. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 19, 45~65.
 76. Weiner, F. F., Czaja, M., J., Giambrone, M-A., Takahashi, S., Biempica, L. and Zern, M. A.(1987) Transcriptional and posttranscriptional effects of dexamethasone on albumin and procollagen messenger RNAs in murine Shchistosomiasis. *Biochem.*, 26, 1557~1562.
 77. Zullo, J. N., Cochran, B. H., Huang, A. S. and Stiles, C. D.(1985) Plateletderived growth factor and duoble-stranded RNA stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. *Cell.* 43, 780~793.

- ABSTRACT -

EFFECTS OF INTERFERON- γ ON COLLAGEN AND FIBRONECTIN SYNTHESIS IN PRIMARY CULTURED PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Gwang-Seok Kim, D.D.S., M.S.D., D.D.Sc., Jae-Hyun Sung, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Orthodontics, School of Dentistry Kyungpook National University.

Je-Yong Choi, D.D.S., M.S.D., Hyun-Mo Ryou, D.D.S., M.S.D., D.D.Sc.

Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Kyungpook National University

Interferon- γ has been suggested as a cytokine of connective tissue stabilizer. In addition, it has also been demonstrated that this cytokine inhibited bone remodeling activities of the bone derived cells. In order to illuminate the effects of this cytokine in orthodontic force induced bone remodeling, it was administered to primary cultured periodontal ligament cells which have been known to have some osteoblast like characteristics.

Interferon- γ slightly decreased [^3H]thymidine incorporation rate without a significant change in the total cellular DNA content up to 1000 U/ml, which meant these doses were not cytotoxic to the cell. Total protein synthesis was not influenced by various concentration of interferon- γ whether it was determined by the [^3H]proline incorporation rate or by the Lowry method. The effect of interferon- γ on the individual protein was, however, differential, ie, it increased [^3H]proline incorporation into the noncollagenous protein marginally, while it decreased [^3H]proline incorporation into the collagen, so that it caused dose-dependent suppression of the relative collagen synthesis. On the contrary, the fibronectin synthesis determined by the ELISA was increased by 1000 U/ml of interferon- γ . The differential effects of the interferon- γ on the collagen and fibronectin synthesis exhibited not only their protein level but also the steady state mRNA level. Interferon- γ decreased steady state level of $\alpha 1(\text{I})$ procollagen mRNA significantly, while showing no significant changes in the fibronectin mRNA level. In addition to this, it was also found that indomethacin did not affect on the interferon- γ induced collagen decrease in this cell, which meant prostaglandins were not involved in the process of interferon- γ induced collagen decrease.

So it can be concluded that the incubation of periodontal ligament cells with 1000 U/ml of interferon- γ for 24 hr showed differential effects on the type I collagen and fibronectin gene expression. The decrease in relative collagen synthesis in the protein level was related with decrease in the steady state level of mRNA, while the increase in the fibronectin synthesis in the protein level was not correlated with the mRNA level.