

# 나노방출제어시스템을 이용한 trichloroacetic acid와 epidermal growth factor 방출이 세포골격형성 유전자 발현에 미치는 영향 분석

박미정 · 이성복 · 이석원\*

강동경희대학교치과병원 보철과 경희대학교 치과대학 치과보철학교실

## Analysis of the effect of trichloroacetic acid and epidermal growth factor release on cytoskeleton gene expression using the nano-controlled releasing system

Mi Jeong Park, Richard Leesungbok, Suk Won Lee\*

Department of Biomaterials & Prosthodontics, Kyung Hee University Hospital at Gangdong, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul, Republic of Korea

**Purpose:** Here, we verified that the actin cytoskeletal gene expression of human gingival fibroblasts was altered by the administration of trichloroacetic acid (TCA) and epidermal growth factor (EGF) using the nano-controlled releasing system. **Materials and methods:** The control and experimental groups were divided into 3 groups: the group with the TCA-only nano-controlled releasing system (EXP1), the group with the TCA- and EGF nano-controlled releasing system (EXP2), and the control group (CON) with 48-h incubation. Expression of 26 genes involved in the regulation of actin cytoskeleton were analyzed by real-time PCR followed by the determination of correlations and influential factors using the Pearson correlation analysis and multiple regression analysis. **Results:** Among 23 genes upregulated in EXP1 and EXP2, expression of 14 genes were significantly increased in EXP2 compared to EXP1. On the other hand, LPAR1 was downregulated only in EXP1, GNA13 was upregulated only in EXP2, and F2R was downregulated only in EXP2. Three Rac1-related genes and CDC42 were identified as the influential factors of the actin gene upregulation. **Conclusion:** The actin cytoskeleton genes in human gingival fibroblast were upregulated by the administration of TCA and EGF using HGC-based nano-controlled releasing system. (*J Korean Acad Prosthodont* 2020;58:290-9)

**Keywords:** Actin cytoskeleton; Epidermal growth factor; Fibroblast; Gene expression; Trichloroacetic acid

### 서론

세포골격은 섬유로 이루어진 그물형태의 세포 지지구조이다. 세포골격은 굵기에 따라 미세섬유(액틴 섬유, microfilament), 미세소관(microtubule) 및 중간섬유(intermediate filament)로 구성되어 있다. 이 중 가장 얇은 미세섬유는 액틴(actin) 단백질로 구

성되어 있어 액틴 섬유라고도 불린다. 액틴 섬유는 세포형태를 잡아주고, 세포간 혹은 세포외기질간의 결합을 형성하며, 신호 전달을 매개하고, 세포질 분열 시 합입구를 형성하는 등의 역할을 한다.<sup>1</sup> 이러한 액틴 세포골격에 변화가 생기면, 세포의 운동이나 세포질 분열을 위한 세포의 활성화도 변하게 된다.<sup>2</sup> 외부 자극에 의해서 액틴 세포골격의 변화를 일으키는 기전은 광범위하게

\*Corresponding Author: Suk Won Lee

Department of Biomaterials & Prosthodontics, Kyung Hee University Hospital at Gangdong, Institute of Oral Biology, School of Dentistry, Kyung Hee University, 892 Dongnam-ro, Gangdong-gu, Seoul 05278, Republic of Korea

+82 (0)2 440 7519: e-mail, [ysprosth@hanmail.net](mailto:ysprosth@hanmail.net)

Article history: Received April 22, 2020 / Last Revision July 6, 2020 / Accepted August 6, 2020

©2020 The Korean Academy of Prosthodontics

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

※This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number: HI16C1838).

연구되어져 왔고, 이 기전의 중요한 매개체는 Rho 단백질군으로 밝혀졌다.<sup>3</sup> Rho 단백질군은 Ras 단백질군에 속하는 하위 단백질군으로 GTP가수분해효소(guanosine triphosphatase, GTPase) 기능을 가진다. 포유류 세포에서 가장 잘 알려진 Rho 단백질군의 구성원은 RhoA, Rac1, CDC42이다.<sup>3</sup>

Rho 단백질군이 GTP (guanosine triphosphate)와 결합하여 활성화 상태가 되면, 하위 인자들(downstream effectors)이 활성화되고, 활성화되는 인자들에 따라 세포형태가 변하게 된다.<sup>4</sup> 예를 들어, RhoA가 활성화되면 액틴과 미오신 다발이 형성되고, 이 섬유다발은 세포의 국소접착(focal adhesion)에 관여한다. Rac1이 활성화되면 피막돌기(lamellipodia)같은, 액틴으로 이루어진 주름 모양의 돌출부가 형성된다. CDC42가 활성화되면 사상위족(filopodia)같은, 뾰족한 세포 돌출부가 형성된다.<sup>4</sup> 이외에도 Rho 단백질군은 세포내 함입, 유전자의 전사조절, 세포증식과 형질전환에 연관되어 있다.<sup>5</sup> Rho 단백질군의 활성화는 세포주기의 G1단계에서 S단계로의 이행을 유도함으로써 유전자합성을 야기하고 세포증식을 촉진한다는 것이 밝혀졌다.<sup>6</sup> 본 연구는 Rho 단백질군 중 대표적인 RhoA, Rac1, CDC42에 관여하는 22개의 유전자들과 액틴 단백질과 관련된 4개의 유전자들을 대상으로 진행되었다.

피부과에서 흔히 사용되는 피부재생치료 중 하나인 chemical regeneration of skin scars (CROSS)는 넓어진 모공 혹은 흉터에 고농도 trichloroacetic acid (TCA)를 단독으로 도포하거나 다른 물질과 혼합하여 도포하는 치료방법이다.<sup>7</sup> 피부과학에서와 달리, 치의학에서는 강산인 TCA의 구내 적용이 제한적일 수밖에 없다. 이에 따라, 적정 농도의 TCA를 구내환경에서 안전하게 적용한 후 임상적 조직 재생효과를 확인하기 위한 연구가 진행되고 있고, 이는 치은퇴축과 같은 경우에서 구강연조직 증대에 도움을 줄 것으로 기대된다.<sup>8,9</sup> 구강내에 TCA를 단순도포함으로써 생길 수 있는 위해성을 피하고, 방출양상을 조절하기 위해 본 연구진은 hydrophobically modified glycol chitosan (HGC) 기반의 나노방출제어시스템을 개발하여 TCA와 epidermal growth factor (EGF)가 순차적으로 조절방출될 수 있도록 하였다. HGC 기반 나노방출제어시스템을 이용하여 TCA와 EGF를 세포배양 배지나 성견(canis familiaris)의 경구개 부위 연조직에 적용하였을 때, 세포골격형성과 관련된 여러 유전자들의 발현량변화가 선행연구에서 확인되었다.<sup>10</sup>

본 연구의 목적은 TCA와 EGF를 HGC기반 나노방출제어시스템을 이용하여 인간치은섬유아세포에 조절방출 하였을 때, 액틴 세포골격과 관련된 유전자 발현의 변화양상을 규명하는데 있다.

## 재료 및 방법

### 1. TCA와 EGF가 담지된 나노방출입자의 제작

#### (1) HGC변형 나노방출입자의 제작

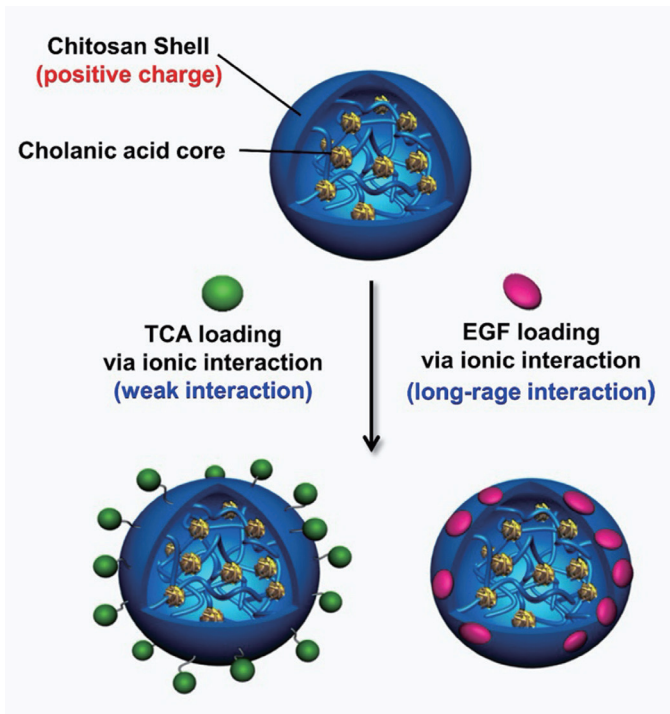
TCA와 EGF가 담지된 나노방출제어시스템을 제작하기 위하여, glycol chitosan (1.0 g,  $0.4 \times 10^5$  mol), 5 $\beta$ -cholanolic-acid (123.0 mg,  $0.34 \times 10^3$  mol), N-hydroxy succinimide (NHS) (58.6 mg,  $0.51 \times 10^3$  mol), N-(3-dimethylaminopropyl)-n'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (97.6 mg,  $0.51 \times 10^3$  mol), TCA (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 메탄올(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), EGF (Peprotech, London, UK)가 시약으로 사용되었다. 10 mL 증류액과 메탄올을 1:1로 배합한 용액에 glycol chitosan (1.0 g,  $0.4 \times 10^5$  mol)과 5 $\beta$ -cholanolic-acid (123.0 mg,  $0.34 \times 10^3$  mol)을 용해시킨 후 N-hydroxy succinimide (NHS) (58.6 mg,  $0.51 \times 10^3$  mol)과 N-(3-dimethylaminopropyl)-n'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (97.6 mg,  $0.51 \times 10^3$  mol)을 24시간 동안 교차반응 시켜서 5 $\beta$ -cholanolic-acid와 결합된 glycol chitosan 나노입자를 제작하였다. 교차반응 후에 나노입자의 정제를 위하여 투석막 (molecular weight cut-off (MWCO): 3,500 g/mol)을 사용한 투석이 24시간 동안 시행되었다. 정제용액으로 증류수와 메탄올 혼합용액(1:3; 6h, 1:1; 6h, 3:1; 6h, v/v)이 사용되었다.

#### (2) TCA가 담지된 나노방출입자의 제작

10 mL 증류수에 HGC를 분산시키고, TCA (1.0 mg,  $0.6 \times 10^5$  mol)를 0.025 mL의 증류수에 용해시켜 준비한 후 TCA용액과 HGC혼합물을 섞어 600 rpm으로 교차반응시켰다. 투석막 (MWCO: 3,500 g/mol)을 사용하여 24시간동안 투석하여 TCA 입자를 정제하고, 감압 하 동결 건조하여 최종적으로 TCA가 담지된 나노입자들을 얻었다. 이온 크로마토그래피를 이용한 C1 정량분석을 통해 담지된 TCA의 양을 측정하였다. 0.5%의 TCA가 담지된 나노입자들을 얻기 위해, 4 mL의 증류수와 2.8 mg의 TCA가 담지된 나노입자들(0.00714 mg TCA / 1 mg TCA가 담지된 나노입자들)을 혼합하였다.

#### (3) TCA와 EGF가 담지된 나노방출입자의 제작

10 mL 증류수에 HGC를 분산시키고, EGF (0.1 mg,  $0.15 \times 10^7$  mol)를 0.1 mL의 증류수에 용해시켜 준비한 후 EGF용액과 HGC혼합물을 섞어 300 rpm으로 교차반응 시켰다. 투석막 (MWCO: 3,500 g/mol)을 사용한 24시간동안의 투석에 반응하지 않은 EGF입자를 제거하고, 감압 하 동결 건조하여 최종적으로 EGF가 담지된 나노입자들을 얻었다. ELISA (Human EGF standard ABTS ELISA Development Kit, Peprotech, London, UK)를 통해 담지된 EGF의 양을 측정하였다. 0.5 %의 TCA가 담지된 나노입자들을 얻기 위해, 4 mL의 증류수와 2.8 mg의 TCA가 담지된 나노입자들(0.00714 mg TCA / 1 mg TCA가 담지된 나노입자들)을 혼합하였다. 2 mL 증류수 속 TCA가 담지된 나노입자들(2.8 mg)과 2 mL의 수용액 속 EGF가 담지된 나노입자들(8.9 mg)을 섞어서 0.5 %의 TCA가 담지된 나노입자들과 80  $\mu$ g의 EGF (8.98  $\mu$ g EGF / 1 mg EGF가 담지된 나노입자들)가 담지된 나노입자들의 혼합액을 얻었다 (Fig. 1).



**Fig. 1.** Diagram of hydrophobically modified glycol chitosan (HGC)-based nano-controlled releasing system for emitting trichloroacetic acid (TCA) and epidermal growth factor (EGF) relatively. Each of TCA and EGF was loaded by ionic bonding onto the chitosan conjugated with hydrophobic cholanic acid.

## 2. 유전자 발현 분석

### (1) 인간치은섬유아세포 배양

ATCC (ATCC<sup>®</sup> PCS-201-018<sup>™</sup>, Manassas, VA, USA)에서 구입한 인간치은섬유아세포를 이용하여 세포 배양하였다. 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 과 항생제를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 에 세포들을 부유시켰다. 부유된 인간치은섬유아세포들은 37°C, 95%의 O<sub>2</sub>, 5%의 CO<sub>2</sub> 조건의 습윤 배양기에서 배양되었다. 2 - 3번의 세포주기 동안 배양된 인간치은섬유아세포가 이 실험에 사용되었다. TCA가 담지된 나노방출제어시스템군(EXP1), TCA와 EGF가 각각 담지된 나노방출제어시스템군(EXP2), 대조군(CON)의 3그룹으로 나누고, 그룹당 5개의 well을 만들어 총 15개의 well에 인간치은섬유아세포를 접종하였다. 세포 밀도가 well당 1 × 10<sup>4</sup>개가 유지되도록 하면서 37°C, 95%의 O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 배양한 후 Trizol lysis solution (TRIZOL<sup>®</sup> REAGENT, GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다.

### (2) 유전자 발현 분석

이전 연구의 KEGG pathway 분석에서 액틴 세포골격의 조절

에 관여하는 Rho 단백질인 RhoA, Rac1, CDC42에 연관된 유전자 22개와 이로 인해 생성되는 액틴 단백질의 유전자 4개를 선정하여 분석하였다.<sup>10</sup> NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 RNA의 농도를 결정하였다. Total RNA 1 µg을 iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, USA)을 이용하여 cDNA로 역전사하였다. 내부대조군인 GAPDH의 발현량을 기준으로 하여 differential display PCR을 통해 인간치은섬유아세포의 mRNA를 선택하였다. 유전자 발현은 TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)을 이용하여 결정하였다. Real-time PCR을 통해 분석한 유전자들은 Table 1에 정리되어 있다. iQ Supermix (Bio-Rad)를 이용하여 Chromo4

**Table 1.** Full name and NCBI references of Genes used in real-time PCR for this research

Gene	NCBI Reference
LPAR1, lysophosphatidic acid receptor 1	NM_001351407.2
CXCR4, C-X-C motif chemokine receptor4	NM_003467.3
F2R, coagulation factor II thrombin receptor	NM_001992.5
GNA12, G protein subunit alpha 12	NM_007353.3
GNA13, G protein subunit alpha 13	NM_006572.6
ARHGEF 1, Rho guanine nucleotide exchange factor 1	NM_004706.4
RHOA, ras homolog family member A	NM_001664.4
ROCK1, Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1	NM_005406.3
SOS1, SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1	NM_005633.3
SOS2, SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2	NM_006939.4
KRAS, KRAS proto-oncogene, GTPase	NM_033360.4
PIK3CB, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta	NM_001259.8
PTK2, protein tyrosine kinase 2	NM_001352701.2
BCAR1, BCAR1 scaffold protein, Cas family member	NM_014567.5
CRK, CRK proto-oncogene, adaptor protein	NM_016823.4
DOCK1, dedicator of cytokinesis 1	NM_001290223.2
RAC1, Rac family small GTPase 1	NM_006908.5
GNB1, G protein subunit beta 1	NM_002074.5
GNG2, G protein subunit gamma 2	NM_053064.5
FGD1, FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1	NM_004463.3
FGD3, FYVE, RhoGEF abd PH domain containing 3	NM_001083536.2
CDC42, cell division cycle 42	NM_001791.4
ACTB, actin beta	NM_001101.5
ACTG1, actin gamma 1	NM_001614.5
ACTR2, actin related protein 2	NM_005722.3
ACTR3, actin related protein 3	NM_005721.5

reverse transcription-polymerase chain reactions (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK)를 시행한 후, 그 유전자 발현량을 MJ Opticon Monitor Analysis Software (Bio-Rad)를 이용하여 정량화 하였다. 측정된 값들은 GAPDH 발현량으로 보정하였고, EXP1과 EXP2의 발현수준은 CON의 상대적인 배수로 표시하였다.

### 3. 통계 분석

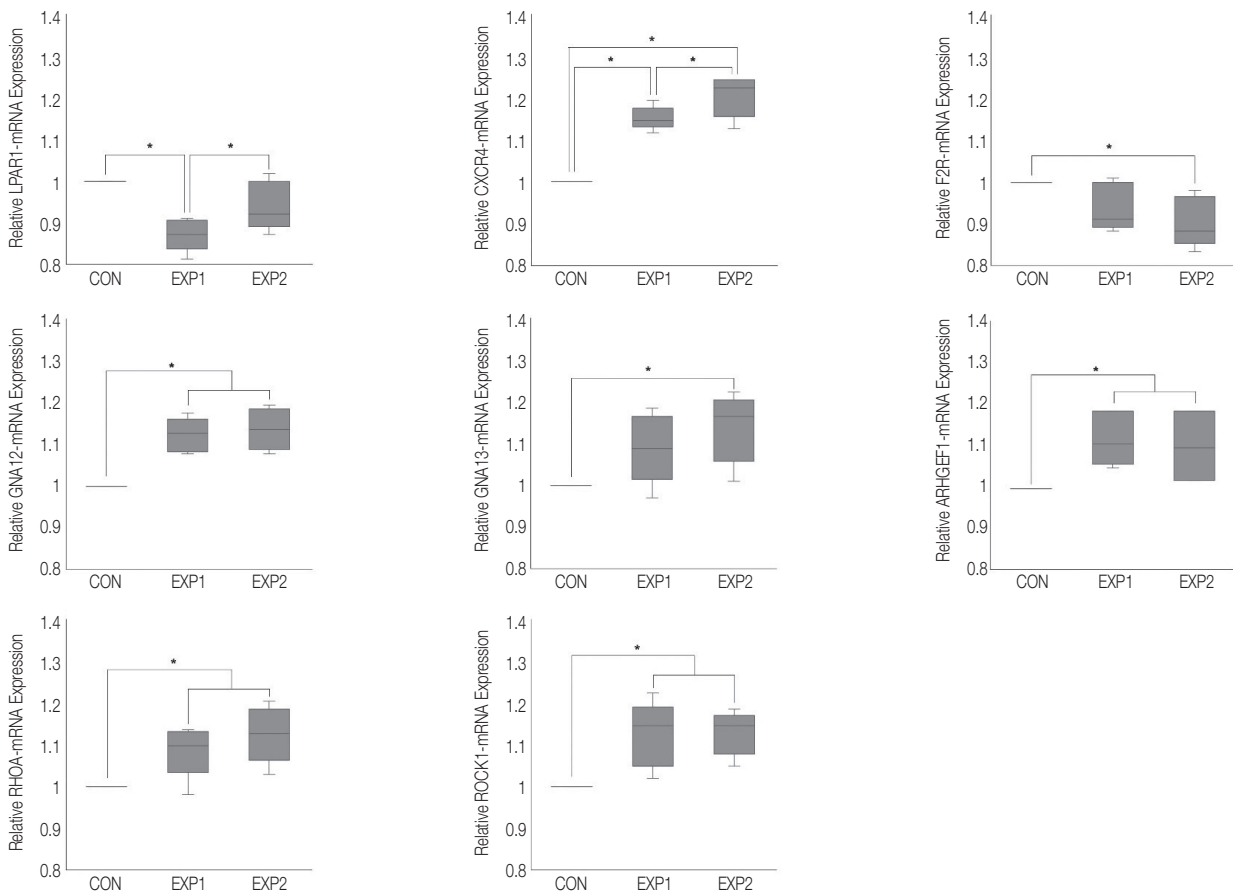
Real-time PCR을 독립적으로 5번씩 반복 시행하여 평균값과 표준편차를 계산하였고, Kruskal-Wallis 검정으로 평균값을 비교하였으며, 사후검정을 위해 본페로니 검정 (Bonferroni correction)을 시행하였다. 피어슨상관관계 분석으로 실험결과 간 상관관계를 분석하였다. ACTB, ACTG1, ACTR2, ACTR3에 통계학적으로 유의한 영향을 미치는 세포골격유전자를 결정하기 위하여 stepwise method를 사용한 다중회귀분석(stepwise multiple regression analysis)을 사용하였다. 모든 통계분석에는 SPSS 18.0 소프트웨어 프로그램 (SPSS 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

## 결과

### 1. Real-time PCR

48시간동안 배양된 인간치은섬유아세포의 유전자들을 real-time PCR로 분석하여, 상향 또는 하향 조절되는 유전자 발현양상이 확인되었다. RhoA와 관련된 8개 유전자들의 유의한 결과는 다음과 같다. LPAR1은 EXP1에서 하향조절되었고, EXP2에서는 대조군에 비하여 유의미한 차이를 보이지 않았다. CXCR4는 EXP1과 EXP2에서 상향조절되었고, EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미하게 증가된 발현량을 나타냈다. F2R은 EXP1에서 대조군에 비하여 유의미한 차이를 보이지 않았고, EXP2에서는 하향조절되었다. GNA13은 EXP1에서 대조군에 비하여 유의미한 차이를 보이지 않았고, EXP2에서는 상향조절되었다. GNA12, ARHGEF1, RHOA, ROCK1은 EXP1과 EXP2에서 상향조절되었고, EXP1과 EXP2간의 유의미한 발현량 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

Rac1과 관련된 9개 유전자들의 유의한 결과는 다음과 같다. SOS1, PTK2, DOCK1은 EXP1과 EXP2에서 상향조절되었



**Fig. 2.** mRNA expression results of the LPAR1, CXCR4, F2R, GNA12, GNA13, ARHGEF1, RHOA and ROCK1, which are related to RhoA regulating actin cytoskeleton. Genes are extracted from human gingival fibroblasts cultured for 48 hours and analyzed using real-time PCR in CON, EXP1, and EXP2. The relative expression levels were normalized with GAPDH mRNA expression, and presented as fold changes relative to the control (CON). Kruskal-Wallis test (n = 5). \*: significant difference ( $P < .05$ ).



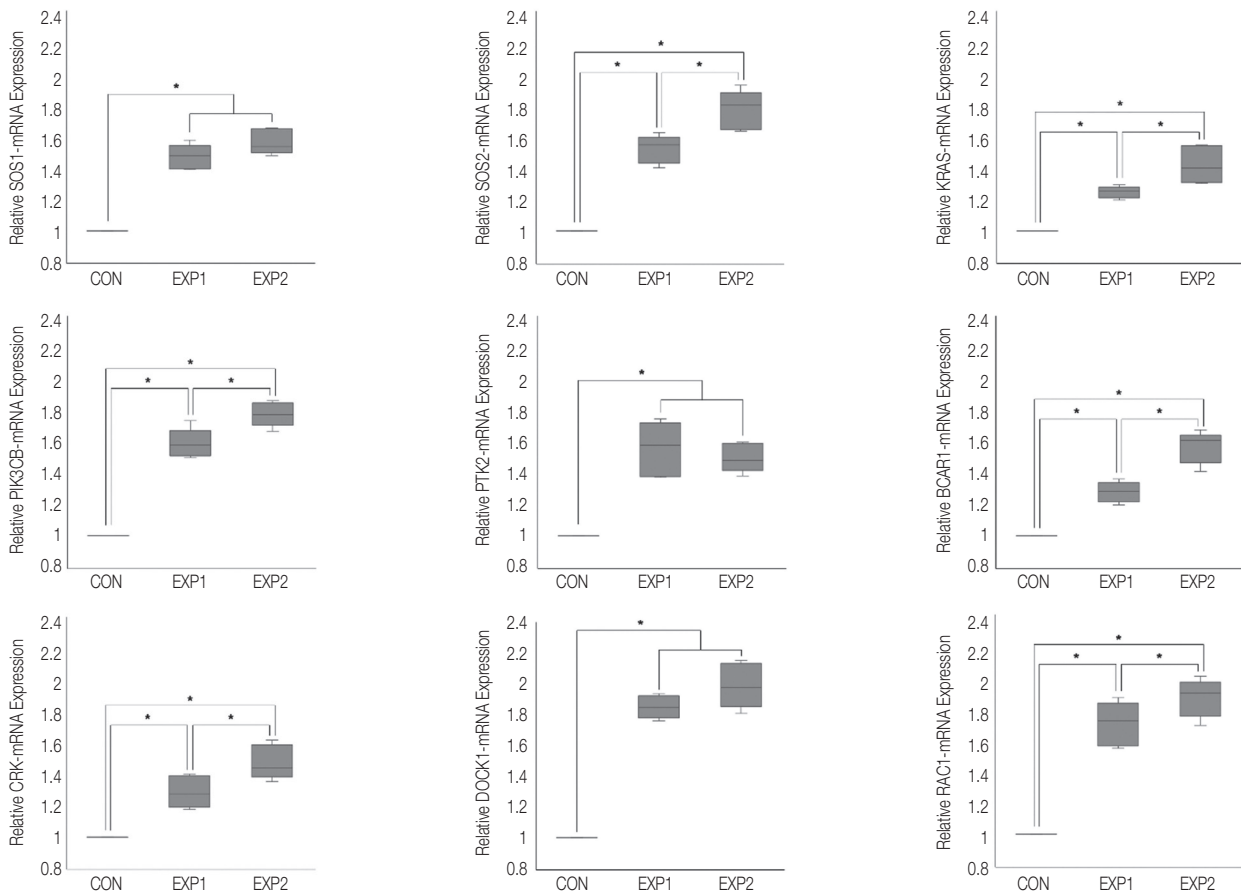
고, EXP1과 EXP2간의 유의미한 발현량 차이를 보이지 않았다. SOS2, KRAS, PIK3B, BCAR1, CRK, RAC1는 EXP1과 EXP2에서 상향조절 되었고, EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미하게 증가된 발현량을 나타냈다 (Fig. 3).

CDC42와 관련된 5개 유전자들의 유의한 결과는 다음과 같다. GNB1, FGD3은 EXP1과 EXP2에서 상향조절 되었고, EXP1과 EXP2간의 유의미한 발현량 차이를 보이지 않았다. GNG2, FGD1, CDC42는 EXP1과 EXP2에서 상향조절 되었고, EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미하게 증가된 발현량을 나타냈다 (Fig. 4).

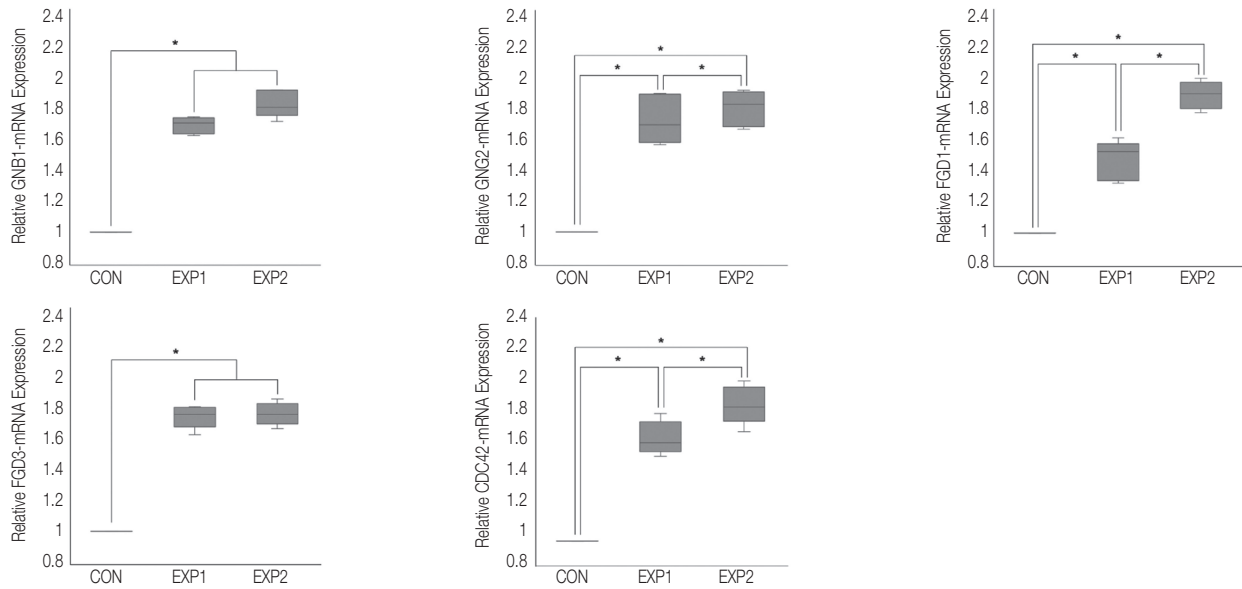
액틴 단백질과 관련된 4개 유전자들의 유의한 결과는 다음과 같다. ACTB, ACTG1, ACTR2, ACTR3는 EXP1과 EXP2에서 상향조절 되었고, EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미하게 증가된 발현량을 나타냈다 (Fig. 5).

## 2. 상관관계 및 영향요인

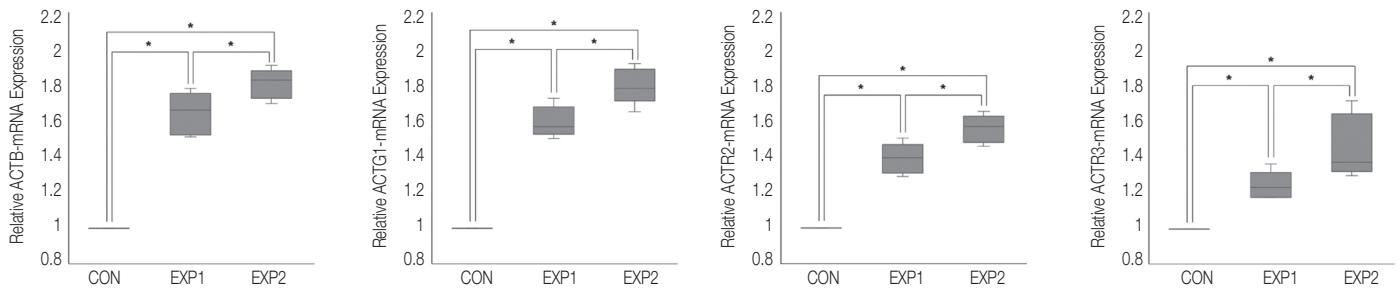
선정된 액틴 세포골격 관련 유전자들의 발현결과 모두를 독립변수로 사용하여 피어슨상관관계분석을 시행한 결과, 몇 가지 비교에서 유전자들의 유의한 상관관계가 나타났다. 액틴 단백질 유전자에 가장 중요한 영향을 미치는 유전자를 규명하기 위해 ACTB, ACTG1, ACTR2, ACTR3의 유전자 발현 결과들을 각각 종속변수로 사용하고, LPAR1, CXCR4, F2R, GNA12, GNA13, ARHGEF1, RHOA, ROCK1, SOS1, SOS2, KRAS, PIK3CB, PTK2, BCAR1, CRK, DOCK1, RAC1, GNB1, GNG2, FGD1, FGD3, CDC42의 유전자 발현 결과들을 독립변수로 사용하여 시행한 다중회귀분석에서는 GNA12, GNA13, ARHGEF1, RHOA, ROCK1, SOS1, SOS2, KRAS, PIK3CB, CRK, DOCK1, RAC1, CDC42, ACTR3가 영향요인으로 선정되었다. 이 중 ACTB, ACTG1, ACTR2, ACTR3의 유전자 발현에 대해 RAC1, CDC42, SOS2, KRAS이 각각 가장 큰 영향요인으로 확인되었다 (Table 2).



**Fig. 3.** mRNA expression results of the SOS1, SOS2, KRAS, PIK3CB, PTK2, BCAR1, CRK, DOCK1 and RAC1, which are related to Rac1 regulating actin cytoskeleton. Genes are extracted from human gingival fibroblasts cultured for 48 hours and analyzed using real-time PCR in CON, EXP1, and EXP2. The relative expression levels were normalized with GAPDH mRNA expression, and presented as fold changes relative to the control (CON). Kruskal-Wallis test (n = 5). \*: significant difference ( $P < .05$ ).



**Fig. 4.** mRNA expression results of the GNB1, GNG2, FGD1, FGD3 and CDC42, which are related to CDC42 regulating actin cytoskeleton. Genes are extracted from human gingival fibroblasts cultured for 48 hours and analyzed using real-time PCR in CON, EXP1, and EXP2. The relative expression levels were normalized with GAPDH mRNA expression, and presented as fold changes relative to the control (CON). Kruskal-Wallis test (n = 5). \*: significant difference ( $P < .05$ ).



**Fig. 5.** mRNA expression results of the ACTB, ACTG1, ACTR2 and ACTR3 regulating actin cytoskeleton. Genes are extracted from human gingival fibroblasts cultured for 48 hours and analyzed using real-time PCR in CON, EXP1, and EXP2. The relative expression levels were normalized with GAPDH mRNA expression, and presented as fold changes relative to the control (CON). Kruskal-Wallis test (n = 5). \*: significant difference ( $P < .05$ ).

## 고찰

피부과학에서 조직의 재생과 치유에 효과가 입증된 TCA는 강한 산성물질로 구강내 직접 적용에는 위험이 따른다. TCA의 위험성을 줄이고 효과적인 구강내 적용을 위해 본 연구진은 결합 조직층까지 침투되어 적절한 농도의 TCA를 방출한 후 순차적으로 EGF를 방출하는 HGC기반의 나노방출제어시스템을 개발하였다.<sup>11</sup> 선행연구에서 HGC기반 나노방출제어시스템을 이용한 TCA의 적용 유무에 따라 유의한 발현량 변화를 보인 성견의 유전자를 대상으로 KEGG pathway를 분석한 결과 세포성장, 재생, 증식과 관련된 27개의 pathway가 보고되었고<sup>10</sup>, 본 연구에서는 보고된 pathway 중 액틴 세포골격의 조절기전과 관련된 26개 유전자들을 분석하였다.

액틴 세포골격은 세포의 형태와 이동, 극성, 세포분열에 관련되어 있고,<sup>3</sup> 액틴 세포골격을 조절한다고 알려져 있는 Rho 단백질군 중 RhoA, Rac1, CDC42에 대한 많은 연구가 이루어져 있다. 외부에서 오는 여러 신호들에 의한 RhoA, Rac1, CDC42의 활성화는 액틴의 발현량을 조절하여 세포형태를 변화시킨다.<sup>4</sup> 액틴 세포골격을 조절하는 인자들은 세포분열주기의 G1단계에 관여하여 다음 세포분열 단계로 진행되도록 유도하므로,<sup>6</sup> 액틴 세포골격 조절과 연관된 유전자들이 상향조절되었다는 것은 세포이동과 세포증식이 증가하였다고 유추해 볼 수 있다.

RhoA의 활성화는 국소접착복합체의 조립으로 이어지고 세포 증식을 촉진한다.<sup>12,13</sup> 이와 관련된 CXCR4, GNA12, ARHGEF1, RHOA, ROCK1 유전자들의 상향조절이 EXP1과 EXP2에서 확인되었다. CXCR4는 내재성 막단백질을 발현하고, 혈관신생

**Table 2.** The influential factors on the expression of ACTB, ACTG1, ACTR2 and ACTR3 after 48 hours of culture and administration of the nano-controlled releasing system to induce sequential release of TCA and EGF, as determined by multiple stepwise regression analysis

Dependent variable	Model	Regression Results	R	R <sup>2</sup>	Sig. <sup>1)</sup>
ACTB	1	ACTB = 0.041 + 0.963·[RAC1]	0.999	0.998	< 0.001
	2	ACTB = 0.649 + 1.091·[RAC1] - 0.740·[GNA12]	1.000	0.999	< 0.001
ACTG1	1	ACTG1 = 0.042 + 0.959·[CDC42]	1.000	0.999	< 0.001
	2	ACTG1 = 0.359 + 1.027·[CDC42] - 0.385·[GNA12]	1.000	1.000	< 0.001
	3	ACTG1 = 0.321 + 1.019·[CDC42] - 0.246·[GNA12] - 0.093·[ROCK1]	1.000	1.000	< 0.001
	4	ACTG1 = 0.284 + 0.947·[CDC42] - 0.205·[GNA12] - 0.100·[ROCK1] + 0.074·[PIK3CB]	1.000	1.000	< 0.001
ACTR2	1	ACTR2 = 0.243 + 0.760·[SOS2]	0.998	0.995	< 0.001
	2	ACTR2 = 0.274 + 0.453·[SOS2] + 0.270·[CDC42]	0.999	0.998	< 0.001
	3	ACTR2 = 0.262 + 0.392·[SOS2] + 0.489·[CDC42] - 0.143·[DOCK1]	0.999	0.999	< 0.001
	4	ACTR2 = 0.258 + 0.376·[SOS2] + 0.342·[CDC42] - 0.214·[DOCK1] + 0.238·[RAC1]	1.000	1.000	< 0.001
	5	ACTR2 = 0.163 + 0.394·[SOS2] + 0.302·[CDC42] - 0.274·[DOCK1] + 0.166·[RAC1] + 0.249·[SOS1]	1.000	1.000	< 0.001
	6	ACTR2 = 0.152 + 0.428·[SOS2] + 0.317·[CDC42] - 0.296·[DOCK1] + 0.133·[RAC1] + 0.298·[SOS1] - 0.032·[ACTR3]	1.000	1.000	< 0.001
	7	ACTR2 = 0.098 + 0.466·[SOS2] + 0.385·[CDC42] - 0.314·[DOCK1] + 0.062·[RAC1] + 0.305·[SOS1] - 0.073·[ACTR3] + 0.072·[ARHGEF1]	1.000	1.000	< 0.001
	8	ACTR2 = 0.125 + 0.472·[SOS2] + 0.414·[CDC42] - 0.321·[DOCK1] + 0.066·[RAC1] + 0.264·[SOS1] - 0.075·[ACTR3] + 0.115·[ARHGEF1] - 0.060·[RHOA]	1.000	1.000	< 0.001
	9	ACTR2 = 0.127 + 0.473·[SOS2] + 0.391·[CDC42] - 0.305·[DOCK1] + 0.053·[RAC1] + 0.289·[SOS1] - 0.072·[ACTR3] + 0.086·[ARHGEF1] - 0.101·[RHOA] + 0.059·[GNA13]	1.000	1.000	< 0.001
	10	ACTR2 = 0.128 + 0.471·[SOS2] + 0.386·[CDC42] - 0.301·[DOCK1] + 0.051·[RAC1] + 0.291·[SOS1] - 0.073·[ACTR3] + 0.082·[ARHGEF1] - 0.104·[RHOA] + 0.065·[GNA13] + 0.005·[CRK]	1.000	1.000	< 0.001
ACTR3	1	ACTR3 = -0.207 + 1.189·[KRAS]	0.979	0.958	< 0.001

<sup>1)</sup> Significances of each regression model were tested by analysis of variance (n = 15).  
 R: coefficient of multiple correlations, R<sup>2</sup>: coefficient of determination.

및 세포기능을 조절한다.<sup>14</sup> GNA12는 G-단백질 알파 서브 유닛 중 하나를 발현하며, 호르몬 및 신경전달물질에 의한 신호를 세포 내 신호전달경로로 전달함으로써 세포기능을 조절한다.<sup>15</sup> ARHGEF1는 Rho 단백질을 활성화시켜 세포골격형성을 유도하는 조절인자이다.<sup>16</sup> RHOA는 세포골격 역학, 전사, 세포주기의 진행 및 세포변형의 조절과 같은 기능의 주요 조절인자이다.<sup>17</sup> ROCK1은 수축력 생성을 촉진하는 액토미오신(actomyosin) 세포골격의 조절인자이다.<sup>18</sup> 위의 EXP1과 EXP2에서 상향조절된 유전자들 중 CXCR4는 EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미하게 증가된 유전자 발현량을 보였다. GNA13은 GNA12와 같이 세포기능을 조절하는 세포 내 신호전달에 관여하는 단백질을 발현하며<sup>15</sup>, EXP2에서만 상향조절되었다. CXCR4와 GNA13이 보인 EXP2에서의 유의미한 증가는 TCA와 EGF가 함께 방출될 때 액틴 세포골격 유전자들의 상향조절 효과가 더 커지는 것을 의미한다. 반면, 다른 RhoA관련 유전자인 LPAR1은 EXP1에서 하향조절되었고, EXP2에서는 대조군에 비하여 유의미한 발현량 차이를 보이지 않았다. LPAR1은 내재성막단백질을 발현하는

유전자로 혈소판 응집, 평활근 수축, 증식, 종양세포의 침습 등의 생물학적 기능을 매개한다.<sup>19</sup> 또 다른 RhoA관련 유전자인 F2R은 EXP1에서는 대조군에 비교하여 유의미한 발현량 차이를 보이지 않았고, EXP2에서는 하향조절되었다. F2R은 응고인자의 수용기를 암호화하고 있어 응고와 염증 사이의 상호작용을 매개하는 데 중요한 역할을 하며, 억제 시 조혈분화를 촉진한다고<sup>20</sup> 알려져 있다. 따라서 TCA와 EGF의 조절방출과 F2R의 하향조절 및 조혈분화 촉진간의 관계에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 위의 유전자 발현양상의 변화는 HGC기반 나노방출제어시스템을 이용한 TCA 및 EGF의 순차적 조절방출로 인간치은섬유아세포의 운동성 증가, 세포활성 증가 및 세포분열 증가를 유도할 수 있음을 시사한다.

Rac1의 활성화는 세포 주변에서 액틴 필라멘트의 밀도를 높이고, 역동적인 그물막구조를 유도하며, 세포증식을 촉진한다.<sup>6</sup> 이와 관련된 유전자들인 SOS1, SOS2, KRAS, PIK3CB, PTK2, BCAR1, CRK, DOCK1, RAC1은 모두 EXP1과 EXP2에서 상향조절되었다. SOS1과 SOS2는 RAS 단백질과 상호

작용하여 세포증식을 알리는 구아닌 뉴클레오티드 교환인자 (guanine nucleotide exchange factor, GEF)이다.<sup>21</sup> KRAS는 세포 성장 및 분화를 제어하는 신호에서 기능하는 막-결합 구아닌 뉴클레오티드-결합 단백질 발현하여, 세포내신호전달경로의 초기에서 세포의 증식이나 분화에 기여한다.<sup>22,23</sup> PIK3CB는 PI3K (phosphoinositide3-kinases)의 소단위이고, 활성화되면 세포 성장을 조절하는 신호 전달 경로에 참여한다.<sup>24</sup> PTK2는 세포부착과 세포확산과정에 관여하는 국소접착단백질을 발현하고, 활성화되면 세포이동성을 증가시킨다.<sup>25</sup> BCAR1는 외부 침입 DNA (deoxyribonucleic acid)를 분해하는 Cas 단백질의 신호 전달에 관여하며, 세포부착, 세포이동, 세포자멸사등을 조절한다.<sup>26</sup> CRK는 여러 신호전달 단백질이 결합하는 어댑터 단백질을 암호화하여 신호전달 경로에 관여하며, DOCK1과 상호작용한다.<sup>27</sup> CRK와 상호작용하는 DOCK1는 구아닌 뉴클레오티드 교환인자의 DOCK계열에 속하며, 뉴클레오티드 교환을 촉진함으로써 이동, 증식, 분화 등의 세포기능을 조절한다.<sup>28</sup> Rac1은 세포 주기, 세포-세포부착, 액틴 세포골격 섬유를 통한 운동성 및 상피 분화등에 영향을 미치는 조절인자이다.<sup>29</sup> 위의 EXP1과 EXP2에서 상향조절된 유전자들 중 SOS2, KRAS, PIK3CB, BCAR1, CRK, RAC1은 EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미하게 증가된 유전자 발현량을 보였다. 이는 TCA와 EGF가 함께 방출될 때 액틴 세포골격 유전자들의 상향조절 효과가 더 커지는 것을 의미한다. 위의 유전자 발현양상의 변화는 HGC기반 나노방출제어 시스템을 이용한 TCA 및 EGF의 순차적 조절방출로 인간치은섬유아세포의 운동성 증가, 세포활성 증가 및 세포분열 증가를 유도할 수 있음을 시사한다.

CDC42의 활성화는 사상위축을 확장시켜 세포를 활성화시키고, 세포분열을 증가시킨다.<sup>6</sup> 이와 관련된 유전자들인 GNB1, GNG2, FGD1, FGD3, CDC42는 EXP1과 EXP2에서 모두 상향조절되었다. GNB1와 GNG2는 수용체와 작동인자단백질 사이에 신호를 통합하는 구아닌 뉴클레오티드-결합 단백질(G-단백질) 알파와 감마의 조절인자이다.<sup>30</sup> FGD1, FGD3는 CDC42를 활성화시키고, 사상위축과 같은 돌출부를 형성하며, 세포가 이동할 수 있도록 한다.<sup>31</sup> CDC42는 세포형태, 세포이동, 세포내이입 및 세포주기진행을 포함한 다양한 세포기능을 조절한다.<sup>32</sup> 위의 EXP1과 EXP2에서 상향조절된 유전자들 중 GNG2, FGD1, CDC42는 EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미하게 증가된 유전자 발현량을 보였다. 이는 TCA와 EGF가 함께 방출될 때 액틴 세포골격 유전자들의 상향조절 효과가 더 커지는 것을 의미한다. 위의 유전자 발현양상의 변화는 HGC기반 나노방출제어 시스템을 이용한 TCA 및 EGF의 순차적 조절방출로 인간치은섬유아세포의 운동성 증가, 세포활성 증가 및 세포분열 증가를 유도할 수 있음을 시사한다.

주요 Rho 단백질군인 RhoA, Rac1, CDC42에 의해 발현되는 ACTB, ACTG1, ACTR2, ACTR3는 인간에서 확인된 액틴의 이소형으로, 세포운동성, 세포구조 및 세포증식에 관여한다.<sup>33</sup> ACTB, ACTG1, ACTR2, ACTR3는 모두 EXP1과 EXP2에서

상향조절되었고, EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미하게 증가된 유전자 발현량을 보였다. 이는 HGC기반 나노방출제어시스템을 이용한 TCA 및 EGF의 순차적 조절방출로 인간치은섬유아세포의 운동성 증가, 세포활성 증가 및 세포분열 증가를 유도할 수 있음을 시사한다.

액틴 유전자들의 가장 큰 영향요인을 분석하기 위한 피어슨상관관계 분석에서 RAC1, CDC42, SOS2, KRAS이 각각 ACTB, ACTG1, ACTR2, ACTR3 발현증가의 가장 큰 영향요인으로 확인되었다. 이 4개의 유전자들 중에서 RAC1, SOS2, KRAS는 Rac1과 관련된 유전자들이므로, 위의 피어슨상관관계 분석결과는 TCA와 EGF의 조절방출로 인해 Rac1과 관련된 유전자들이 가장 상향조절되었음을 의미하며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구를 바탕으로 아래와 같은 결론을 얻을 수 있었다.

액틴 세포골격 조절에 관련된 유전자들은 HGC기반 나노방출제어시스템을 통하여 조절 방출된 TCA와 EGF에 의해 대부분 상향조절 되었다.

액틴 단백질 유전자들은 HGC기반 나노방출제어시스템을 통하여 조절 방출된 TCA와 EGF에 의해 유의하게 상향조절 되었다.

본 연구에서는 HGC기반 나노방출제어시스템을 이용한 TCA와 HGC의 조절방출이 인간치은섬유아세포의 액틴 세포골격의 발현을 유도함을 세포수준에서 확인하였다. 이를 통해 인간의 치은조직 재생효과에 대한 가능성이 확인되었다. 향후 동물모델과 전 임상구명을 통한 생체 내 연구를 통해 TCA와 EGF의 구내 적용 가능성을 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

## ORCID

Mi Jeong Park <https://orcid.org/0000-0002-2444-0399>

Richard Leesungbok <https://orcid.org/0000-0002-8381-723X>

Suk Won Lee <https://orcid.org/0000-0003-2726-3567>

## References

- Hardin J, Bertoni G, Kleinsmith LJ. Becker's World of the cell. 8th ed. New York: Pearson; 2015. p. 422-46.
- Fishkind DJ, Wang YL. New horizons for cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:23-31.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-14.
- Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001;11:471-7.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420:629-35.



6. Lamarche N, Tapon N, Stowers L, Burbelo PD, Aspenström P, Bridges T, Chant J, Hall A. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 1996;87:519-29.
7. Lee JB, Chung WG, Kwahck H, Lee KH. Focal treatment of acne scars with trichloroacetic acid: chemical reconstruction of skin scars method. *Dermatol Surg* 2002;28:1017-21.
8. Yasar S, Mansur AT, Serdar ZA, Goktay F, Aslan C. Treatment of focal epithelial hyperplasia with topical imiquimod: report of three cases. *Pediatr Dermatol* 2009;26:465-8.
9. Heithersay GS, Wilson DF. Tissue responses in the rat to trichloroacetic acid-an agent used in the treatment of invasive cervical resorption. *Aust Dent J* 1988;33:451-61.
10. Park KM. A study based on sequential tissue coagulation-proliferation nano controlled release system for oral soft tissue regeneration. Master's thesis. Department of Dentistry, Graduate School, Kyung Hee University. 2019.
11. Lee K. Evaluation of the effect on oral soft tissue regeneration of the trichloroacetic acid in cellular models-a gene expression profiling study, Master's thesis. Department of Dentistry, Graduate School, Kyung Hee University. 2018.
12. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70:401-10.
13. Yamamoto M, Marui N, Sakai T, Morii N, Kozaki S, Ikai K, Imamura S, Narumiya S. ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* 1993;8:1449-55.
14. Caruz A, Samsom M, Alonso JM, Alcamí J, Baleux F, Virelizier JL, Parmentier M, Arenzana-Seisdedos F. Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett* 1998;426:271-8.
15. Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987;56:615-49.
16. Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G $\alpha$ 12 and G $\alpha$ 13. *Science* 1998;280(5372):2109-11.
17. Kiss C, Li J, Szeles A, Gizatullin RZ, Kashuba VI, Lushnikova T, Protopopov AI, Kelve M, Kiss H, Kholodnyuk ID, Imreh S, Klein G, Zabarovsky ER. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79:228-30.
18. Rath N, Olson MF. Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. *EMBO Rep* 2012;13:900-8.
19. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:157-86.
20. Yue R, Li H, Liu H, Li Y, Wei B, Gao G, Jin Y, Liu T, Wei L, Du J, Pei G. Thrombin receptor regulates hematopoiesis and endothelial-to-hematopoietic transition. *Dev Cell* 2012;22:1092-100.
21. Webb GC, Jenkins NA, Largaespada DA, Copeland NG, Fernandez CS, Bowtell DD. Mammalian homologues of the *Drosophila* Son of sevenless gene map to murine chromosomes 17 and 12 and to human chromosomes 2 and 14, respectively. *Genomics* 1993;18:14-9.
22. Goodsell DS. The molecular perspective: the ras oncogene. *Oncologist* 1999;4:263-4.
23. Tsuchida N, Ryder T, Ohtsubo E. Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science* 1982;217:937-9.
24. Hu P, Mondino A, Skolnik EY, Schlessinger J. Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol Cell Biol* 1993;13:7677-88.
25. Chan KT, Cortesio CL, Huttenlocher A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J Cell Biol* 2009;185:357-70.
26. Janoštiak R, Pataki AC, Brábek J, Rösler D. Mechanosensors in integrin signaling: the emerging role of p130Cas. *Eur J Cell Biol* 2014;93:445-54.
27. Mayer BJ, Hanafusa H. Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2638-42.
28. Meller N, Merlot S, Guda C. C2H proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci* 2005;118:4937-46.
29. Zhou C, Licciulli S, Avila JL, Cho M, Troutman S, Jiang P, Kossenkov AV, Showe LC, Liu Q, Vachani A, Albelda SM, Kissil JL. The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis. *Oncogene* 2013;32:903-9.
30. Ogorodnikov A, Levin M, Tattikota S, Tokalov S, Hoque M, Scherzinger D, Marini F, Poetsch A, Binder H, Macher-Göppinger S, Probst HC, Tian B, Schaefer M, Lackner KJ, Westermann F, Danckwardt S. Transcriptome 3' end organization by PCF11 links alternative polyadenylation to formation and neuronal differentiation of neuroblastoma. *Nat Commun* 2018;9:5331.
31. Egorov MV, Capestrano M, Vorontsova OA, Di Pentima A, Egorova AV, Mariggio S, Ayala MI, Tetè S, Gorski JL, Luini A, Buccione R, Polishchuk RS. Faciogenital dysplasia protein (FGD1) regulates export of cargo proteins from the golgi complex via Cdc42 activation. *Mol Biol Cell* 2009;20:2413-27.
32. Qadir MI, Parveen A, Ali M. Cdc42: Role in cancer management. *Chem Biol Drug Des* 2015;86:432-9.
33. Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci* 2015;128:2009-19.

# 나노방출제어시스템을 이용한 trichloroacetic acid와 epidermal growth factor 방출이 세포골격형성 유전자 발현에 미치는 영향 분석

박미정 · 이성복 · 이석원\*

강동경희대학교치과병원 보철과 경희대학교 치과대학 치과보철학교실

**목적:** 본 연구에서는 나노방출제어시스템을 이용하여 trichloroacetic acid (TCA) 및 epidermal growth factor (EGF)를 인간치은섬유아세포에 적용하였을 때, 나타나는 액틴 세포골격과 관련된 유전자 발현의 변화 양상을 확인하고자 하였다.

**재료 및 방법:** TCA와 EGF가 조절방출될 수 있도록 만들어진 나노방출제어시스템을 이용하였다. 인간치은섬유아세포에 TCA만 적용된 군(EXP1), TCA와 EGF가 적용된 군(EXP2), 대조군(CON)의 3가지 군으로 나누어 48시간 배양하였다. Real-time PCR을 이용하여 액틴 세포골격과 관련된 유전자 26개의 발현 양상을 분석하였다. 피어슨상관관계분석을 통해 유전자들의 상관관계와 영향요인을 확인하였다.

**결과:** 액틴 세포골격과 관련된 유전자 26개 중 23개가 EXP1과 EXP2에서 상향조절되었고, 이 중 14개는 EXP1에 비하여 EXP2에서 유의미한 발현량 증가를 보였다. LPAR1은 EXP1에서만 하향조절되었고, GNA13은 EXP2에서만 상향조절되었고, F2R은 EXP2에서만 하향조절되었다. 액틴 단백질의 유전자 발현에 대하여 Rac1 관련 유전자 중 3개와 CDC42가 가장 큰 영향요인으로 확인되었다.

**결론:** 인간치은섬유아세포의 액틴 세포골격 관련 유전자들은 나노방출제어시스템을 통하여 조절 방출된 TCA와 EGF에 의해 대부분 상향조절되었다. (대한치과보철학회지 2020;58:290-9)

**주요단어:** 액틴 세포골격; 표피성장인자; 섬유아세포; 유전자 발현; 트라이클로로아세트산

\*교신저자: 이석원

05278 서울 강동구 동남로 892 강동경희대학교치과병원 보철과

02 440 7519; e-mail, ysprosth@hanmail.net

원고접수일: 2020년 4월 22일 / 원고최종수정일: 2020년 7월 6일 / 원고채택일: 2020년 8월

6일

© 2020 대한치과보철학회

© 이 글은 크리에이티브 커먼즈 코리아 저작자표시-비영리 4.0 대한민국 라이선스에 따라 이용할 수 있습니다.

※ This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number: HI16C1838).