

2

치아 및 치주복합체 항상성에서 phosphatase and tension homolog (PTEN)의 역할

Running title : PTEN 유전자와 치아복합조직체

김예현#, 최원준#, Ni Xiong, 임원희

서울대학교 치의학전문대학원 치과교정학교실, 서울대학교 치과병원 교정과

#표기된 두 저자는 공동의 제1저자로서 본 연구에 동일하게 기여하였습니다.

ORCID ID

Ye-hyun Kim,  <https://orcid.org/0009-0005-3983-6010>Wonjun Choi,  <https://orcid.org/0000-0002-8550-1677>Ni Xiong,  <https://orcid.org/0000-0002-2935-537X>Won Hee Lim,  <https://orcid.org/0000-0003-4803-4835>

ABSTRACT

Effect of phosphatase and tension homolog (PTEN) on periodontal complex

Running title : PTEN and periodontal complex

Ye-hyun Kim#, Wonjun Choi#, Ni Xiong, Won Hee Lim

Department of Orthodontics, School of Dentistry, Seoul National University,
Department of Orthodontics, Seoul National University Dental Hospital

#These authors equally contributed to this work as first author

Purpose: Phosphatase and tension homolog (PTEN) has been known to play a role of maintenance of homeostasis over the body. It is little known about the roles of PTEN in periodontal complex. The purpose of this study was to explore the role of PTEN in periodontal complexes after removing PTEN from osteoblasts and odontoblasts.

Materials and Methods: The resulting OCN-Cretg^{+/+};Pten^{fl/fl} mice were created after by conditionally eliminating the PTEN gene using an Osteocalcin (OCN) Cre driver and the resulting OCN-Cretg^{+/+};Pten^{fl/fl} mice (experimental group) were compared with the wild type mice (control group) using micro-CT, histology and immunohistochemical analyses. The amount of dentin and alveolar bone was analyzed, and osteopontin and bone sialoprotein in the periodontal ligament space (PDL) were evaluated and collagen in the PDL was analyzed quantitatively and qualitatively.

Results: Micro CT showed that dentin and bone were significantly accumulated in an experimental group. Dentin sialoprotein was significantly increase in dentin of an experimental group. Internal balance in the PDL was altered with increased expression of PCNA in an experimental group.

Conclusions: Loss of PTEN causes an increase of dentin and bone in the periodontal complexes with an alteration of internal balance in the PDL. These findings underscore the effect of PTEN on homeostatic control of periodontal complexes.

Key words : PTEN, homeostasis, periodontal complex

Corresponding Author

Won Hee Lim, DDS, MS, PhD

Department of Orthodontics, Seoul National University Dental Hospital,
101, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul, 03080, Republic of Korea.

Tel : +82 2 2072 0272 / Fax : +82 2 2072 3817 / E-mail : whlim@snu.ac.kr

ACKNOWLEDGEMENT This study was supported by grant no 05-2016-0015 from the SNUDH Research Fund.

I. 서론

종양 억제제 (tumor suppressor)로 알려진 phosphatase and tension homologue (PTEN)은 세포분화 조절에 관여한다¹⁾. PI3K/Akt 경로를 통하여 세포 분화와 세포자연사 (apoptosis)를 조절한다^{1,2)}. PTEN 유전자의 변이는 암, 비종양성 이상증식과 뇌질환을 일으킨다³⁾. 또한 PTEN 유전자의 변이는 여러 기관에서 코우덴 증후군 (Cowden syndrome)과 과오종 (hamartomas)를 야기하는 것으로 알려져 있다³⁻⁵⁾.

쥐의 조골세포 (osteoblast)에서 PTEN 유전자를 상실한 쥐는 태어날 당시는 정상 골크기이지만 평생동안 골밀도와 골량이 증가한다^{6,7)}. 이는 조골세포의 세포자연사 (apoptosis)와 관련이 있다. PTEN 유전자의 변이로 인한 세포자연사의 감소로 인하여 간의 교원질 섬유증의 축적과 폐의 섬유증을 야기한다^{8,9)}. PTEN 유전자의 변이가 섬유아세포에서 일어날 경우에 교원질 섬유증의 기질내 세포자연사의 방해로 가져온다¹⁰⁾.

PTEN 유전자 변이가 있을 경우에 아데노이드얼굴 (adenoid faces), 고 구개궁 (high-arched palate), 연구개의 형성부전, 입술과 인두의 유두종 (papillomatosis), 치주질환, 균열설 (fissured tongue), 점막 유두종과 잇몸결절 (gingival nodule)등의 양상이 나타난다⁵⁾. 즉 PTEN 유전자 변이가 치아와 주변 치주조직의 기능에 영향을 미칠 것이라고 생각할 수 있다. 그러나, 치아 및 주위 조직의 항상성 유지에 PTEN 유전자가 관여하는지에 관한 연구는 아직까지 거의 없다. 조골세포에서 PTEN 유전자를 제거한 쥐를 이용하여 PTEN 유전자가 치아와 치주조직의 항상성에 미치는 영향을 조사하는 것이 이 논문의 목적이다.

II. 재료 및 방법

1. OCN-Cre^{tg/+}PTEN^{fl/fl} mice

PTEN 유전자 적중 생쥐 (gene targeting mouse: 실험군)와 일반쥐 (대조군)는 Van Andel Research Institute의 동물 보호와 사용 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))로부터 승인을 얻어서 만들었다⁶⁾. 쥐 꼬리에서 DNA를 채취하여 AutoGenprep 960 automated DNA isolation system (AutoGen)을 사용하여 PTEN 유전자 적중 (gene targeting) 여부를 확인하였다. 대조군과 실험군에서 각각 12주령 열마리 쥐를 사용하였다.

2. 마이크로 CT (Micro-computed tomography) 촬영

SkyScan 1172 MicroXCT-200 (SkyScan, Kontich, Belgium)를 이용하여 12주령 여섯마리 (세마리 대조군, 세마리 실험군) 쥐의 상악골을 마이크로 씨티로 촬영했다. 촬영조건은 60kV, 7.98W와 2 μ m의 해상도이며, 8 μ m³의 isotropic voxel size이며, 전치부에서는 800 CT slices이었다. 분석을 위하여 각각의 CT slices는 MicroXCT7.0 reconstruction software (SkyScan 1076, SkyScan, Aartselaar, Belgium)을 이용했다. 3차원으로 합성을 한 후 치아의 상아질과 치수강의 크기와 주변 치조골의 양을 비교하였다.

3. 조직표본 제작

대조군 다섯 마리와 실험군 다섯 마리 쥐에서 상악골을 분리하여 4°C에서 4% 파라포름알데하이드에서 하룻밤 고정시킨 후 19% EDTA에서 2주일 동안 탈회를 시켰다. 여러 단계의 에탄올 시리즈를 걸쳐서 탈수화 시킨 후

embedding 한 후 8-um 두께로 자른 후 Superfrost plus 슬라이드(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 조직샘플을 제작하였다.

4. 일반염색분석

Hematoxylin and eosin (H&E) staining을 시행하여 전반적인 치주조직의 구조를 분석했다. H&E 염색에서 세포핵은 파란색으로, 그 외의 세포질등은 분홍색으로 염색되었다. 또한 picosirius red 염색을 통하여 치주인대안의 교원질의 주행 방향들을 분석했다¹¹⁾.

살아있는 세포 수를 측정하기 위하여 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 염색을 시행한 후 형광현미경 하에서 촬영했다. 죽은 세포 수를 측정하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 키트를 이용하여 (Roche, Basel, Switzerland) 염색한 후 형광현미경 하에서 촬영했다.

5. 면역조직화학 (Immunohistochemistry) 염색 분석

조직표본에서 파라핀을 제거한 후 (deparaffinized), 5 분동안 hydrogen peroxide에 담가서 peroxidase activity를 얻은 후 phosphate-buffered saline (PBS)에서 씻었다. 5% goat serum (Vector, Burlingame, CA, USA) 으로 처리 후 1시간 동안 기다렸다. 각각의 1차 항체 (primary antibody)를 추가한 후에 4 ° C 냉장고에 하룻밤 보관했다. biotinylated 2차 항체 (secondary antibodies: Vector, Burlingame, CA, USA)로 30분 동안 처리 후 PBS로 씻었다. Anavidin/biotinylated enzyme complex 키트(ABC Peroxidase Standard Vectastain PK-4000; Vector, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 30분동안 처리했다. 색이 나타나도록 3,3'-diaminoben-

zidine (DAB) substrate 키트 (Vector Peroxidase substrate DAB SK-4100; Vector, Burlingame, CA, USA)를 사용했다. 사용된 항체 (antibody)는 osteopontin (OPN, NIH LF 17, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; dilution 1: 4000), dentin sialoprotein (DSP, Merck Millipore, Burlington, MA, USA; dilution 1: 2000), Bone sialoprotein (BSP, Origene, Rockville, MA, USA; dilution 1:800), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; dilution 1:50), periostin (Abcam, Milton, Cambridge, UK; 1:100 dilution), fibromodulin (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA; 1:1000 dilution), and type I collagen (Abcam, Milton, Cambridge, UK; 1:100 dilution) 이었다. 면역조직화학 염색을 통하여 백악질 형성에 관여하는 OPN과 BSP의 발현양과, 상아질 형성에 관여하는 DSP의 발현양을 비교 분석했으며, 교원 섬유양의 양적, 질적 분석을 시행하였다.

III. 결과

전체적인 치아의 크기와 모양은 두 그룹 사이에 차이가 없었다(Fig. 1.A & B). 그러나, 법랑질 형성은 실험군에서 다른 양상을 보였다. 대조군에서 치근단쪽 (apex)에서 일정 부분 떨어진 부위에서부터 법랑질 침착이 시작되나, 실험군에서는 치근단부위부터 침착된 법랑질이 치아 절단면 (incisal edge)까지 이어져있었다. 대조군과 비교했을 때 실험군에서는 상악 전치 주변 치조골의 골량의 증가를 볼 수 있었다(Fig. 1.A & B). 또한, 실험군에서 상아질 침착을 관찰할 수 있었다. 상아질의 침착과 함께 치수강의 감소가 실험군에서 관찰되었다. 실험군에서 상아질의 침착은 치근단쪽까지 이어져 있었다.

실험군의 상악 구치와 주변조직을 포함한 사진에서 치

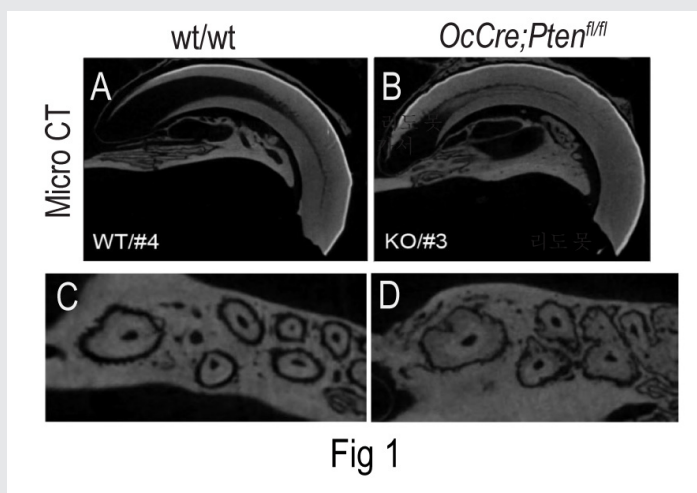


Figure 1. 마이크로 CT 분석

(A, B) There was no difference of tooth size and shape between a control and an experimental group. However, the amount of dentin and alveolar bone was increased in an experimental group compared to that in a control group. (C, D) In an experimental group, the width of periodontal ligament space was decreased and rough root surface was observed.

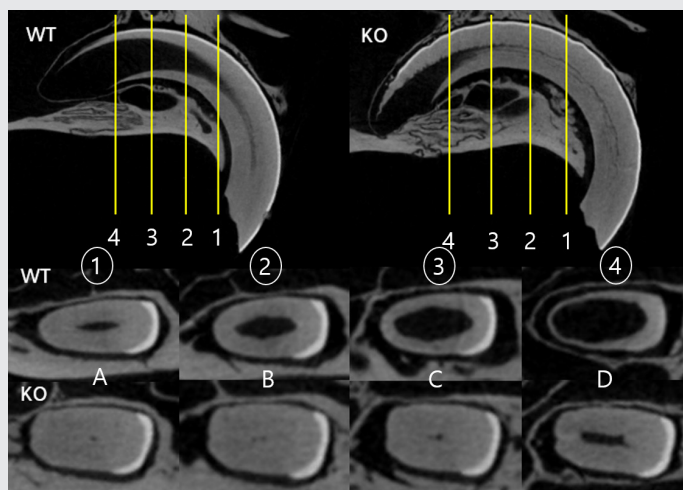


Figure 2. 치아의 수직 단면 분석

(A) The pulp space was not observed in an experimental group on the 1st plane. (B) The pulp space was scarcely observed in an experimental group on the 2nd plane. (C) The size of the pulp was very small in an experimental group on the 3rd plane. (D) The size of pulp in an experimental group on the 4th plane was the same as that in a control group on the 1st plane.

주인대의 공간의 감소와 불규칙한 치근이 관찰되었다 (Fig. 1.C & D).

전치부 치아에서 상아질 침착과 치수강의 감소의 변화를 치근단 부위, 치근단으로부터 1.2 μ m, 1.8 μ m, 2.4 μ m로 나누어 살펴보면 치아절단면에서 가까운 곳인 (1)에서 자른 단면에서 보면 정상적인 치아 구조를 가진 대조군에 비해서 실험군에서는 치수강이 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 2A). (2)에서 자른 단면을 살펴보면 실험군에서는 여전히 치수강이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2B). (3)에서 자른 단면을 살펴보면 실험군에서 점 정도 크기의 치수강이

관찰되었다(Fig. 2C). (4)에서 자른 단면에서 대조군은 넓은 치수강을 가진 반면 실험군에서는 대조군의 (1)의 위치에서 보이는 치수강의 면적을 보여주었다(Fig. 2D). 또한, 실험군에서 치조골의 양이 증가함을 볼 수 있었다. 대조군에서는 (4)에서 자른 단면에서 법랑질의 침착을 거의 볼 수 없으나 실험군에서는 (1)의 단면과 같은 양의 침착된 법랑질을 볼 수 있었다.

정상적인 치아의 구조에서 벗어나서 치수강이 좁아진 것의 원인을 찾기 위하여 면역염색을 시행하였다. 백악질을 만드는 요소 중 하나인 OPN의 발현양은 대조군과 비

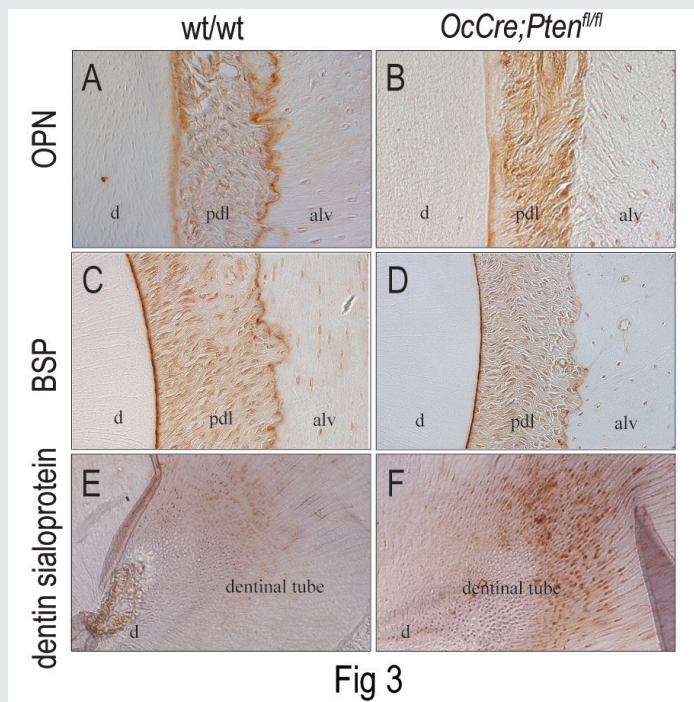


Figure 3. 면역형광염색을 통한 치아구조의 관찰

(A) There was no different expression of osteopontin between a control and an experimental group. (B) There was no different expression of bone sialoprotein between a control and an experimental group. (C) Expression of dentin sialoprotein was increased in an experimental group. d, dentini; ab, alveolar bone; p, pulp; pdl, periodontal ligament. All scale bars are 500 μ m.

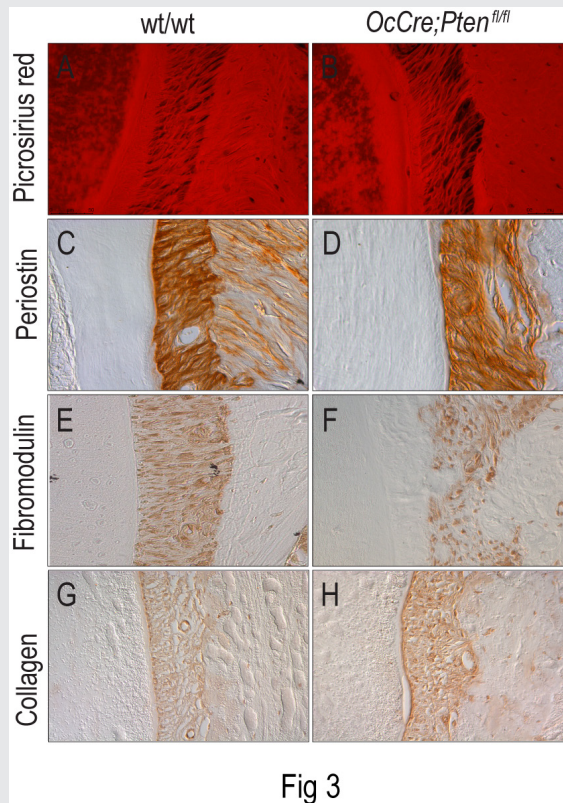


Fig 3

Figure 4. 치주인대 내의 분자 생물학적 변화

(A, B) Picrosirius red staining showed no difference of orientation of collagen fibers between a control and an experimental group. (C, D) Expression of periostin showed no difference between a control and an experimental group. (E, F) Expression of fibromodulin was decreased in an experimental group. (G, H) Expression of collagen was increased in an experimental group. d, dentin; ab, alveolar bone; p, pulp; pdl, periodontal ligament. All scale bars are 500 μ m.

교했을 때 실험군에서 차이가 없었다(Fig. 3A). 백악질을 만드는 다른 요소인 BSP의 발현정도를 비교해 볼 때 대조군과 실험군 사이에 차이는 없었다(Fig. 3B). 상아질 형성에 관여하는 DSP의 발현정도에서는 대조군과는 달리 실험군에서는 발현량이 유의미하게 증가하였다(Fig. 3C).

치주인대의 콜라겐 섬유 함량의 전반적인 구조 등을 관찰하기 위해 picrosirius red, periostin, fibromodulin과

collagen염색을 시행하였다(Fig. 4). 교원질 섬유 함량의 주행 방향은 대조군과 비교했을 때 실험군에서 다르지 않으며 교원질 섬유 사이의 거리도 비슷하며 전반적인 양도 다르지 않음을 알 수 있었다(Fig. 4A & B). 치주인대 안에서 발현되는 osteoblast인자인 periostin 발현정도도 대조군과 실험군 사이에서 차이를 발견할 수 없다(Fig. 4C & D). 대조군에서 fibromodulin의 발현정도는 콜라

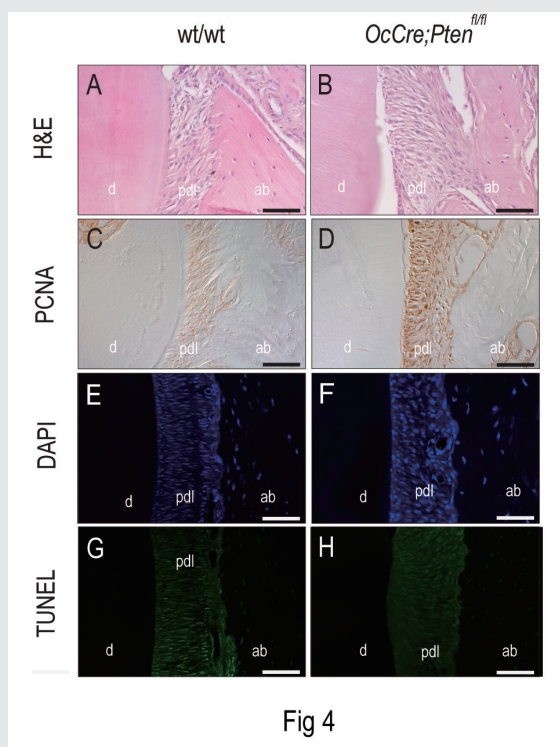


Fig 4

Figure 5. 치주인대 내의 세포 변화

(A, B) H&E staining showed no difference in general structure between a control and an experimental group. (C, D) Expression of PCNA was increased in an experimental group. (E, F) DAPI staining showed an increase of cell density in an experimental group. (G, H) TUNEL staining showed a decrease of apoptosis in an experimental group. d, dentin; ab, alveolar bone; p, pulp; pdl, periodontal ligament. All scale bars are 500 μ m.

겐 섬유에서 뚜렷하게 발견되어 있는 반면, 실험군에서 fibromodulin의 발현정도는 대조군과 비교 시 감소되었음을 볼 수 있었다(Fig. 4.E & F). 실험군에서 collagen의 발현정도는 대조군보다 증가되었음을 볼 수 있었다(Fig. 4.G & H).

H&E염색을 통해서 전체적인 치주인대내의 구조를 살펴보면 대조군과 실험군 사이에서 교원질의 주행방향에 차이가 없었다(Fig. 5.A & B). PCNA염색을 보면 실험군

에서 증식하는 세포의 발현정도가 상당히 증가되어 있었다(Fig. 5.C & D). PCNA 염색은 세포주기의 G1초기와 S 단계의 세포 marker로 증식하는 세포수가 실험군에서 증가되어 있었다. DAPI 염색을 통해 보면 대조군에 비하여 실험군에서 세포의 밀도가 증가해 있었다(Fig. 5.E & F). 또한, TUNEL염색을 통해 보면 실험군에서 apoptosis가 감소되어 있었다(Fig. 5.G & H).

IV. 고찰

PTEN은 정상적인 치아조직 (odontogenic tissues)의 세포질에서 발현되며 세포분화에 관여한다¹²⁾. 그러나 PTEN이 치아와 주변 치주조직의 항상성에 미치는 영향에 대하여는 많이 보고되지 않았다. 실험군에서 모든 치아들은 대조군과 크기와 모양도 같고 정상적으로 맹출하여 정상적인 기능을 한다.

마이크로 CT 영상에서 상아질의 지속적인 형성으로 인해 치수강이 좁아지는 것이 실험군에서 관찰되었다. 즉 실험군에서 odontoblast가 DSP의 발현양을 증가시켜서 상아질이 더 많이 분비되었다고 생각할 수 있다¹³⁾. 이 부분에 관한 정확한 기전에 대해서는 더 연구가 진행되어야 한다.

전신적인 골량과 골밀도의 증가를 보이는 실험군에서 치조골의 골량의 증가가 관찰되었다¹⁶⁾. 전신적인 골조직의 변화를 치조골에서도 관찰할 수 있었으며, 더 나아가 치아를 구성하는 법랑질, 상아질, 백악질의 양의 증가도 관찰되었다. 전신적 골조직의 변화가 있을 때 치조골뿐 아니라 치아에도 변화를 가져왔다. Wnt signal이 감소된 쥐에서 골조직의 변화가 치아를 포함한 주변조직에 영향을 미치는 등 연관성이 관찰되었다¹³⁾.

실험군에서 교원질의 주행 방향에는 차이가 없으나 치주인대 안에서 관찰되는 특이한 점은 증식되는 세포의 증가와 함께 apoptosis되는 세포의 감소이다. PTEN 소실 시 다른 조직에서 세포증식이 이어지며 apoptosis가 감소하는데 이를 치주인대 안에서 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 이런 변화들이 다른 조직에서는 섬유화를 야기하고¹⁴⁾ 잇몸 증식을 야기하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

치주인대 안의 교원섬유에 부착하는 fibromodulin의 정확한 역할이 알려지지 않았지만, prenentin의 경화를 억제하는 것으로 볼 때 경조직에 둘러싸인 치주인대의 석회화를 막는데 기여하는 것으로 추측하고 있다^{16,17)}. 실험

군에서 fibromodulin의 발현정도가 대조군보다 감소되어 있는 것으로 볼 때 prenentin의 경화로 인해서 치주인대의 공간이 감소하는 원인으로 생각할 수 있다.

PTEN유전자 변이가 일어났을 때 전신적인 골량과 골밀도의 증가와 함께 치조골과 주변 경조직인 상아질의 침착을 관찰할 수 있었다. 따라서, 그 기전에 대한 연구를 진행할 때 전신적인 골대사의 이상이 치아, 치조골의 이상과도 연관지어 생각하여 보며 치료법에 대해서도 같이 고민해 볼 수 있다.

이해상충

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

참고 문헌

1. Burgers TA, Hoffmann MF, Collins CJ, et al. Mice lacking pten in osteoblasts have improved intramembranous and late endochondral fracture healing. *PLoS One* 2013;8:e63857.
2. Jang HD, Noh JY, Shin JH, Lin JJ, Lee SY. PTEN regulation by the Akt/GSK-3 β axis during RANKL signaling. *Bone* 2013;55:126-131.
3. Hsieh SC, Chen NT, Lo SH. Conditional loss of PTEN leads to skeletal abnormalities and lipoma formation. *Mol Carcinog* 2009;48:545-552.
4. Deng L, Huang L, Sun Y, Heath JM, Wu H, Chen Y. Inhibition of FOXO1/3 promotes vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:175-183.
5. Scheper MA, Nikitakis NG, Sarlani E, Sauk JJ, Meiller TF. Cowden syndrome: report of a case with immunohistochemical analysis and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:625-631.
6. Liu X, Bruxvoort KJ, Zylstra CR, et al. Lifelong accumulation of bone in mice lacking Pten in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2259-2264.
7. Ford-Hutchinson AF, Ali Z, Lines SE, Hallgrímsson B, Boyd SK, Jirik FR. Inactivation of Pten in osteo-chondroprogenitor cells leads to epiphyseal growth plate abnormalities and skeletal overgrowth. *J Bone Miner Res* 2007;22:1245-1259.
8. Xie SR, An JY, Zheng LB, et al. Effects and mechanism of adenovirus-mediated phosphatase and tension homologue deleted on chromosome ten gene on collagen deposition in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2017;23:5904-5912.
9. Parapuram SK, Thompson K, Tsang M, et al. Loss of PTEN expression by mouse fibroblasts results in lung fibrosis through a CCN2-dependent mechanism. *Matrix Biol* 2015;43:35-41.
10. Nho RS, Xia H, Diebold D, et al. PTEN regulates fibroblast elimination during collagen matrix contraction. *J Biol Chem* 2006;281:33291-33301.
11. Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 1994;89:397-410.
12. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of phosphorylated Akt, PI3K, and PTEN in ameloblastic tumors. *Oral Dis* 2007;13:461-467.
13. Lim WH, Liu B, Cheng D, et al. Wnt signaling regulates pulp volume and dentin thickness. *J Bone Miner Res* 2014;29:892-901.
14. Tian Y, Li H, Qiu T, et al. Loss of PTEN induces lung fibrosis via alveolar epithelial cell senescence depending on NF- κ B activation. *Aging Cell* 2019;18:e12858.
15. Pham C, Wang L, Lea V, Rathore P. Necrotising granulomatous mass of the foreskin with inguinal lymphadenopathy: a rare presentation of syphilis. *BMJ Case Rep* 2021;14.
16. Hedlund H, Mengarelli-Widholm S, Heinegard D, Reinholt FP, Svensson O. Fibromodulin distribution and association with collagen. *Matrix Biol* 1994;14:227-232.
17. Goldberg M, Septier D, Oldberg A, Young MF, Ameye LG. Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation. *J Histochem Cytochem* 2006;54:525-537.