[UCI]I804:24011-200000233857

*2007*년 *2*월
박사학위논문

*Melatonin*이 *MDPC-23* 세포의 분화에 끼치는 영향

조선대학교 대학원

치의학과

신 인 철

*Melatonin*이 *MDPC-23* 세포의 분화에 끼치는 영향

Effects of Melatonin on MDPC-23 cells Differentiation

*2007*년 *2*월 일

조선대학교 대학원

치의학과

신 인 철

*Melatonin*이 *MDPC-23* 세포의 분화에 끼치는 영향

지도교수 김 홍 중

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

*2006*년 *10*월 일

조선대학교 대학원

치의학과

신 인 철

신인철의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교 수	김 병 옥	인
위 원	연세대학교	교 수	최 성 호	인
위 원	조선대학교	교 수	박 주 철	인
위 원	조선대학교	교 수	김 수 관	인
위 원	조선대학교	교 수	김 홍 중	인

*2006*년 *12*월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차 ii
도목차 iii
ABSTRACT iv

I. 서론 1
II. 재료 및 방법 3
Ⅲ. 결과 6
Ⅳ. 고찰 8
Ⅴ. 결론 11
Ⅵ. 참고문헌 12

사진부도 설명 17
사진부도 19

표 목 차

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR.....4

도 목 차

Fig. 1. Dose responses of melatonin on the expression of mRNAs for DSPP, OC, ALP and NFI-C.....19

Fig. 2. DSPP expression in MDPC-23 cells.....20

Fig. 3. OC expression in MDPC-23 cells.....20

Fig. 4. ALP expression in MDPC-23 cells.....21

Fig. 5. NFI-C expression in MDPC-23 cells.....21

Fig. 6. Photomicrograph of Alizarin Red-S stained MDPC-23 control and melatonin-treated cells.....22

Fig. 7. Phase contrast micrographs of Alizarin Red-S stained MDPC-23 control and melatonin-treated cells.....22

ABSTRACT

Effects of Melatonin on MDPC-23 cells Differentiation

Shin, In-Cheol

Advisor: Kim, Heung-Joong, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

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

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

The results were as follows:

1. Cultures containing melatonin at day 15 showed extensive mineralization as compared with control cultures.

2. Melatonin increased the expression of DSPP and OC mRNAs in MDPC-23 cells in a concentration-dependent manner. However melatonin not changed ALP expression.
3. Melatonin markedly decreased mRNA expression of NFI-C in early stage cultures as compared with control cultures.

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

I. 서 론

Melatonin은 송과선(pineal gland)에서 분비되는 주요 호르몬으로 지금까지 melatonin에 대한 대사와 기능적 연구에 의하면 신체의 여러 생리학적 및 병태생리학적 조절에 중요한 역할을 수행한다[2,6,9,17,21,23,26]. Melatonin은 밤에 그 분비가 증가하여 시상하부에 의한 일간리듬(diurnal rhythms)의 조절[6,17], 계절에 따라 출산을 하는 계체들에 있어서 생식의 조절[2,17], melatonin의 농도에 따라 여러 세포들의 분화에 영향[9,26], 연령증가에 따른 감소[23] 등을 주요한 특징으로 한다. 또한 melatonin은 유방암세포의 증식을 억제하는데 이는 밤에 일하는 여성의 경우 유방암 발생율이 더 높다[9]. 또한 Pierpaoli와 Reglelson[23]는 melatonin이 노화억제제(anti-aging agent)로 작용하여 melatonin을 투여한 흰쥐에서 수명이 20% 연장되었다고 보고하였다.

Melatonin은 세 개의 transmembrane receptor(Mel R1a, -1b, -1c)를 가지고 있는데 이들 모두는 G protein과 결합하여 cAMP의 형성을 조절한다[11,24,30]. 여성의 경우 폐경기 이후에 melatonin의 분비가 감소하여 골다공증을 일으키는데 관여하고, 골모세포와 파골세포의 호르몬 조절에 있어서 중요한 인자로 작용한다[5]. Melatonin은 골모세포의 증식과 type I collagen의 합성을 촉진하고[19], 골모세포전구세포인 MC3T3 세포에서 골모세포로의 분화와 골바탕질의 석회화를 촉진시키며, 골성장 조절에 있어 중요한 역할을 한다[25].

치아의 형성은 치성상피와 외배엽성 간엽세포 사이의 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되는 복잡한 발생과정을 통해 이루어진다[18]. 치성상피는 치아기(dental organ)를 형성하여 법랑모세포를 분화시켜 법랑질을 형성하고, 외배엽성 간엽세포는 치유두(dental papilla)를 형성하여 상아모세포와 치수세포를 분화시켜 상아질과 치수를 형성한다[20].

상아모세포는 외배엽성 간엽세포로부터 상아모세포 전구세포(preodontoblast)를 거쳐 상아모세포로 분화하는 과정에 주로 type I collagen과 같은 유기바탕질과 일

부 지질 및 dentin sialophosphoprotein (DSPP), dentin matrix protein(DMP), osteonectin(ON), osteocalcin(OC), osteopontin(OP) 등과 같은 비아교성 바탕질을 합성하고 분비한다[3,10,22]. 그러나 melatonin이 상아모세포로의 분화과정에 끼치는 영향에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

Nuclear factor I (NFI) family는 전사-복제 인자들로 NFI-A, NFI-B, NFI-C, NFI-X의 네 가지 유전자들로 이루어져 있으며[7], 많은 세포성 유전자들의 발현에 중요한 역할을 한다[13]. 최근에 Steele-Perkins 등[28]은 NFI-C를 knock out하면 생쥐에서 치관부는 정상이지만 치근이 짧거나 비정상적으로 형성된다고 하여, NFI-C가 치근 상아질 형성을 위한 상아모세포의 분화과정에서 중요한 역할을 함을 시사하였다.

위의 여러 연구들에 기초하여 본 논문에서는 Hanks 등[16]이 CD1 생쥐 대구치의 치유두에서 분리한 상아모세포 전구세포인 MDPC-23 세포를 이용하여 melatonin이 상아모세포에서 석회화 결절의 형성을 촉진하는지를 확인하였다. 또 melatonin이 상아질-특이 단백인 DSPP와 석회화 표지 인자인 OC와 ALP 및 최근의 연구에서 상아모세포의 분화와 관련이 것으로 알려진 NFI-C의 발현에 끼치는 영향에 대하여 비교, 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양 및 분화

생쥐 대구치 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 상아모세포 전구세포인 MDPC-23 세포(5 x 10^5 cells / 60 mm dish)[16]를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제(Penicillin 100U/ml, Streptomycin 100 ㎍/ml 및 fungizone 2.5㎍/ml, Gibco BRL, Rockville, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's 배양액(DMEM, Gibco BRL, Rockville, USA)에서 confluency가 될 때까지 배양하였다. MDPC-23 세포의 상아모세포로의 분화는 5% FBS, ascorbic acid (AA; 50 ㎍/ml) 및 β-glycerophosphate (GP; 10 mM)가 포함된 DMEM 배양액에서 15일간 배양 하였다. 실험군은 Me_2SO에 melatonin(Sigma-Aldrich, St, Louis, Mo, USA)을 50nM과 100 nM씩 녹여 첨가하였고, 대조군은 같은 양의 Me_2SO만 첨가하였다.

2. 석회화 결절의 확인

MDPC-23 세포(2.7 x 10^5 cells / 35-mm dish)에 melatonin(50nM과 100nM)을 첨가한 실험군과 첨가하지 않은 대조군을 5일, 10일, 15일 후에 1xPBS로 3회 세척하고 70% ethanol로 20분간 고정한 다음, 0.1% NH_4OH가 함유된 1% Alizarin Red-S(Sigma-Aldrich, St, Louis, Mo, USA) 용액으로 염색하여 석회화 결절을 3회 반복하여 확인하고 위상차 현미경으로 관찰하였다.

3. 총 *RNA* 추출 및 *RT-PCR* 분석

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

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

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

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

4. Densitometry 분석

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

5. 통계적 분석

각각의 실험군과 대조군의 densitometry 분석의 통계처리는 Students′ t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였고, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. DSPP 유전자 발현

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

2. OC 유전자 발현

OC의 발현은 DSPP와 유사한 양상을 보였다. 대조군에서 15일까지 일정하게 발현이 증가 하였으며, melatonin 50nM을 처리한 군에서는 대조군과 비슷하게 증가하다가 15일째에 크게 증가하여 대조군보다 2배 정도 높은 발현을 보였다. 100nM을 처리한 군에서는 5일째부터 대조군과 melatonin 50nM을 처리한 군에 비교하여 발현량이 증가하여, 10일째부터 크게 증가하였다. 15일째 melatonin을 50nM과 100nM을 처리한 두 실험군의 발현양이 유사하였다(Fig. 1과 3).

3. ALP 유전자 발현

ALP의 발현은 실험군과 대조군 모두에서 분화가 진행되는 동안 미약한 발현양의 증가를 보였으나, 각 군에서의 발현양의 차이는 보이지 않았다(Fig. 1과 4).

4. NFI-C 유전자 발현

NFI-C의 발현은 MDPC-23 세포의 분화가 진행함에 따라 발현양이 감소하였으며, 특히 melatonin을 처리한 실험군에서 대조군과 비교하여 초기에 2배 정도 빠르게 발현양이 감소함을 보였다(Fig. 1과 5).

5. 석회화결절의 형성 확인

MDPC-23 세포는 GP/AA가 첨가된 DMEM 배양액(분화 배양액)에서 상아모세포로 분화하였다. 이들 세포는 분화 배양액에서 적어도 15일 동안 배양하였을 때 석회화 결절을 형성하였다. 배양 5일째 모든 군에서 석회화 결절이 관찰되지 않았다(Fig. 6). Melatonin의 농도가 증가할수록 석회화 결절 형성을 촉진하였는데, 분화 15일 째 melatonin을 첨가하지 않은 군에 비해 첨가한 군에서 석회화 결절 형성이 촉진되었다(Fig. 7).

Ⅳ. 고 찰

송과선에서 분비되는 melatonin은 밤에 분비가 증가하여 인체의 밤과 낮의 주기 조절에 관여하고 연령의 증가에 따라 그 분비량이 감소하여 노화의 진행과 밀접한 관련을 갖는다[5,6,9]. Cardinali 등[5]은 골에 대한 melatonin의 임상적 적용에서 여성의 경우 폐경기이후에 melatonin의 감소가 골다공증을 일으키는데 관여한다고 하여 골모세포와 파골세포의 호르몬 조절에 있어서 중요한 인자로 melatonin을 보고하였다. Nakade 등[19]은 *in vitro*에서 melatonin이 골모세포의 증식과 type I collagen의 합성을 촉진시킨다고 하였고, Roth 등[25]은 melatonin은 골모세포분화와 바탕질의 석회화를 촉진시키며, 골성장 조절에 있어 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

본 연구에서는 상아모세포 전구세포인 MDPC-23 세포를 이용하여 melatonin이 상아모세포로의 분화와 석회화 결절의 형성에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하였다. MDPC-23 세포는 Hanks 등[16]이 CD1 생쥐 대구치의 치유두에서 분리하여 만든 세포주로 일정한 조건에서 배양하면 분화하여 상아모세포의 특성을 나타낸다[8,15,29]. 배 등[1]의 실험에서도 MDPC-23 세포를 배양하여 DSPP mRNA의 발현을 관찰하였다. 이는 치유두 세포주인 MDPC-23 세포가 상아모세포의 특성을 나타내며, 상아모세포의 분화과정을 연구하는데 MDPC-23 세포가 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

이 실험에서 석회화 결절 형성에 관하여 살펴보면, MDPC-23 세포에 GP/AA를 첨가하여 15일 동안 배양하였을 때 석회화가 일어났다. Melatonin의 농도가 증가할수록 석회화결절 형성을 촉진하여 분화 15일째는 melatonin을 첨가하지 않은 군에 비해 melatonin을 첨가한 군에서 석회화 결절의 형성이 강하게 관찰되었다. Roth 등[25]은 골모세포 전구세포인 MC3T3 세포를 이용한 실험에서 melatonin을 첨가하지 않은 군에서는 21일이 되어서야 석회화결절이 형성됨에 반하여 melatonin 50nM을 첨가한 군에서는 12일째에 석회화 결절이 형성되었다고 하였

다.

상아모세포-특이 유전자인 DSPP는 ALP, OC과 같은 석회화 표지 단백과 함께 상아질의 석회화를 유도한다. DSPP는 비아교성 단백질에 속하는 대표적인 상아질-특이 단백질로 하나의 유전자로부터 dentin sialoprotein과 dentin phosphoprotein의 두 가지 단백질을 합성하며 상아질의 석회화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[12,27]. OC는 골모세포, 상아모세포, 백악모세포에 의해서 합성되는 비아교성 단백질로 석회화 후기에 주로 발현된다[4,22]. Alkaline phosphatase(ALP)의 활성은 모든 무기질침착 조직의 형성과 관련이 있다[14].

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

Roth 등[25]은 MC3T3 세포에 melatonin을 첨가한 경우에는 첨가하지 않은 군에 비해 골모세포-특이 유전자인 BSP와 ALP, OP, OC와 같은 다른 석회화 표지자들의 유전자 발현이 증가하였다고 보고하였다. 또한 melatonin은 세 개의 막투과 수용체를 가지고 있는데 골모세포 분화가 이들 수용체에 의해 조절되는지를 규명하기 위하여 막투과 수용체에 경쟁적 억제제(competitive inhibitor)인 luzindole과 함께 처리한 실험에서 luzindole은 melatonin에 의해 유도된 BSP와 ALP의 발현을 감소시킨다고 보고하였다. 앞으로 상아모세포에서도 막투과 수용체의 억제제에 의해서 melatonin의 효과가 감소되는지 연구가 필요하다고 생각된다. 위의 두 연구에 의하면 melatonin은 골모세포에서와 비슷하게 상아모세포의 분화와 석회화를 촉진

함을 알 수 있다.

NFI-C는 치아 발생과정에서 외배엽성 간엽세포에는 발현되지 않으나, 상아모세포 전구세포에서 발현되기 시작하여 상아모세포의 분화가 진행되어 감에 따라 발현이 증가한다[28]. NFI-C가 상아모세포 뿐만 아니라 골모세포에도 발현되지만 NFI-C (-/-) 생쥐에서 치근 상아질 형성에만 이상이 초래된 것은, NFI-C가 상아모세포에만 선택적으로 작용함을 의미한다[28]. 배 등[1]의 연구에 의하면 NFI-C (-/-) 생쥐의 상아모세포는 키가 작고 타원형 모양으로 세포 극성이 상실되는 등 매우 불규칙한 양상을 보였다. 이 결과는 NFI-C 유전자의 결손이 일어나면 세포 사이 결합장치의 형성이 방해되어 상아모세포가 비정상적으로 분화하고, 이에 따라 비정상적인 상아질이 형성되는 것으로 생각할 수 있다.

배 등[1]은 MDPC-23 세포에서 NFI-C를 과발현 시킨 3일 후에 DSPP mRNA의 발현이 증가함을 확인하였다. 이는 DSPP가 상아모세포의 분화 후기에 발현이 증가한다는 것을 생각하면, NFI-C에 의해 DSPP의 발현이 촉진되었음을 의미한다. 본 연구에서는 NFI-C는 MDPC-23 세포가 분화함에 따라 발현양이 감소하였으며, 특히 melatonin을 처리한 군에서 두 배정도 빠르게 발현량이 감소함을 보여 주었다. 위의 결과들은 NFI-C가 상아모세포의 분화 초기에 작용함을 의미하며, melatonin에 의해서 상아모세포의 분화가 촉진됨에 따라 NFI-C의 작용도 그와 비례하여 빨라지는 것으로 생각된다.

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

V. 결 론

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

본 연구에서는 상아모세포 전구세포인 MDPC-23 세포를 이용하여 melatonin이 상아모세포 분화를 촉진시키는 지를 확인하였다. MDPC-23 세포에 분화 배양액과 melatonin을 첨가하여 분화를 유도시킨 후, RT-PCR을 이용하여 DSPP, OC, ALP와 NFI-C의 발현 변화를 분석하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

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

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

Ⅵ. 참고문헌

1. 배현숙, 김흥중, 정문진, 박민주, 안성민, Gronostajski RM, 박주철. 상아모세포 분화과정에서 nuclear factor I-C의 역할. 대한구강악안면병리학회지 29(2):83-92, 2005.

2. Batmanabane M, Ramesh KP. Effect of exogenous melatonin on the onset of puberty in female albino rats. Anat Rec 245:519-524, 1996.

3. Begue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch J.V, Lesot H. Comparative analysis of TGF-βs, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. Int J Dev Biol 38:405-420, 1994.

4. Bronckers AL, Price PA, Schrijvers A, Bervoets TJ, Karsenty G. Studies of osteocalcin function in dentin formation in rodent teeth. Eur J Oral Sci 106:795-807, 1998.

5. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effect on bone: experimental facts and clinical perspectives. J Pineal Res 34:81-87, 2003.

6. Cassone VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. Trends Neurosci 13:457-464, 1990.

7. Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM. Expression patterns of the four

nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. Dev Dyn 208:313-325, 1998.

8. Cho MI, Matsuda N, Lin W-L, Moshier A, Ramakrishnan PR. In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. Calcif Tissue Res 50:459-467, 1992.

9. Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin inhibition of MCF-7 human breast-cancer cells growth: influence of cell proliferation rate. Cancer Lett 93:207-212, 1995.

10. D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein (DMP1) and dentin sialophophoprotein (DSPP) suggest distinct development function *in vivo*. J Bone Miner Res 12:2040-2047, 1997.

11. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? Trends Pharmacol Sci 16:50-56, 1995.

12. Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'Souza RN, Kozak CA, MacDougall M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. J Biol Chem 273:9457-9464, 1998.

13. Gronostajski RM. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. Gene 249:31-45, 2000.

14. Hanawa M, Takano Y, Wakita M. An autoradiographic study of calcium movement in the enamel organ of rat molar tooth germ. Arch Oral Biol 35:899-908, 1990.

15. Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. Eur J Oral Sci 106(suppl I):260-266, 1998.

16. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. Connect Tissue Res 37:233-249, 1998.

17. McMillen IC, Houghton DC, Young IR. Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity. J Reprod Fertil 49(suppl):137-146, 1995.

18. Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. Arch Oral Biol 32:123-127, 1987.

19. Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. J Pineal Res 27:106-110, 1999.

20. Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed., St. Louis, Mosby, 2003, pp 78-103.

21. Nowak JZ, Zawilska JB. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. Pharm World Sci 20:18-27, 1998.

22. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. Bone 30:377-385, 2002.

23. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. Proc Natl Acad Sci 91:787-791, 1994.

24. Reppert SM, Weaver DR, Godson K. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. Trends Pharmacol Sci 17:100-102, 1996.

25. Roth JA, Kim BK, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Biol Chem 274:22041-22047, 1999.

26. Roth JA Rabin R, Agnello K. Melatonin suppression of PC12 cell growth and death. Brain Res 768:63-70, 1997.

27. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. Arch Oral Biol 38:571-576, 1993.

28. Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, Zeichner-David M, Kim HJ, Cho MI, Gronostajski RM. Essential Role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. Mol Cell Biol 23:1075-1084, 2003.

29. Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Begue-Kirn C, Wataha JC, Hanks CT, Butler WT. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. Connective Tissue Res 37:251-261, 1998.

30. Yung LY, Tsim S-T, Wong YH. Stimulation of cAMP accumulation by the cloned Xenopus melatonin receptor through Gi and Gz proteins. FEBS Lett 372:99-102, 1995.

사진부도 설명

Fig. 1. Dose responses of melatonin on the expression of mRNAs for DSPP, OC, ALP and NFI-C. Confluent MDPC-23 cells were grown for 0, 5, 10 and 15 days in differentiation media containing various concentrations of melatonin as indicated. Total RNA was isolated, and mRNA expression of DSPP, OC, ALP, NFI-C and GAPDH was assessed by RT-PCR analysis. DSPP, dentin sialophosphoprotein OC, osteocalcin ALP, alkaline phosphatase NFI-C, nuclear factor I-C; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Fig. 2. DSPP expression in MDPC-23 cells. A densitometric analysis of endogenous DSPP expressions in MDPC-23 cells with or without melatonin. Results are means ± SD from three independent experiments. $p < 0.05$(*).

Fig. 3. OC expression in MDPC-23 cells. A densitometric analysis of endogenous OC expressions in MDPC-23 cells with or without melatonin. Results are means ± SD from three independent experiments. $p < 0.05$(*).

Fig. 4. ALP expression in MDPC-23 cells. A densitometric analysis of endogenous ALP expressions in MDPC-23 cells with or without melatonin. Results are means ± SD from three independent experiments. $p < 0.05$(*).

Fig. 5. NFI-C expression in MDPC-23 cells. A densitometric analysis of endogenous NFI-C expressions in MDPC-23 cells with or without melatonin. Results are means ± SD from three independent experiments. $p < 0.05$(*).

Fig. 6. Photomicrographs of Alizarin Red-S stained MDPC-23 control and melatonin-treated cells. MDPC-23 cells were plated on 35-mm dishes at a density of 2.7 x 10^5 cells/dish. Cultures were stained at 5 and 15 days after treatment with GP/AA only (A), melatonin 50 nM/GP/AA (B) melatonin 100nM/GP/AA (C).

Fig. 7. Phase contrast micrographs of Alizarin Red-S stained MDPC-23 control and melatonin-treated cells. MDPC-23 cells were plated on 35-mm dishes at a density of 2.7 x 10^5 cells/dish. Cultures were stained at 5(A) and 15(B, C) days after treatment with GP/AA only (B), melatonin 100 nM/GP/AA (A, C).

사진부도

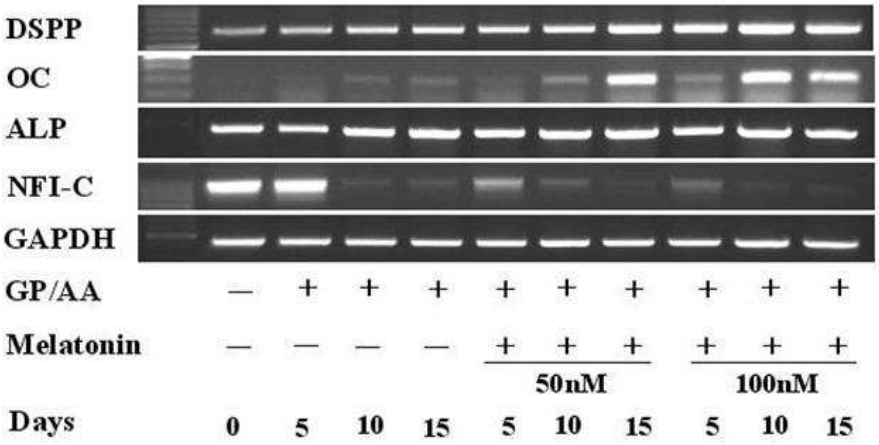
DSPP
OC
ALP
NFI-C
GAPDH
GP/AA — + + + + + + + + +
Melatonin — — — — + + + + + +
50nM
100nM
Days 0 5 10 15 5 10 15 5 10 15

Fig. 1.

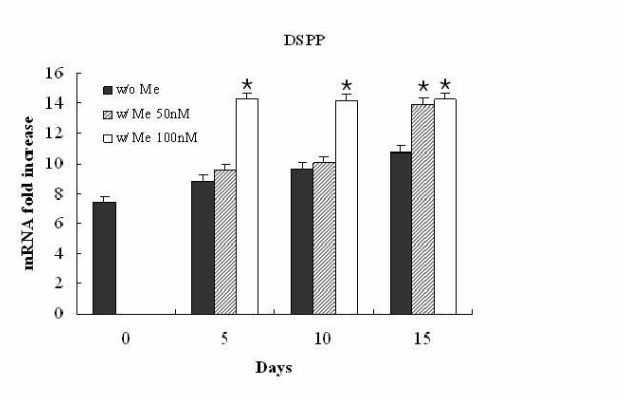
DSPP
w/o Me
w/ Me 50nM
w/ Me 100nM
mRNA fold increase
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
5
10
15
Days

Fig. 2.

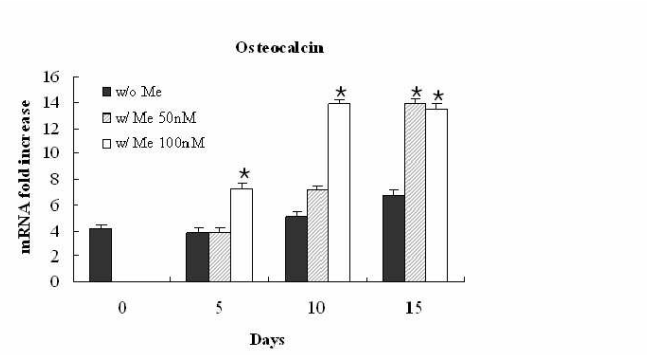
Osteocalcin
w/o Me
w/ Me 50nM
w/ Me 100nM
mRNA fold increase
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
5
10
15
Days

Fig. 3.

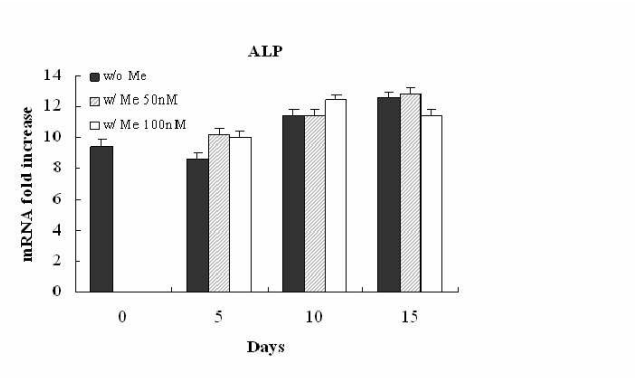
ALP
w/o Me
w/ Me 50nM
w/ Me 100nM
mRNA fold increase
14
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
Days

Fig. 4.

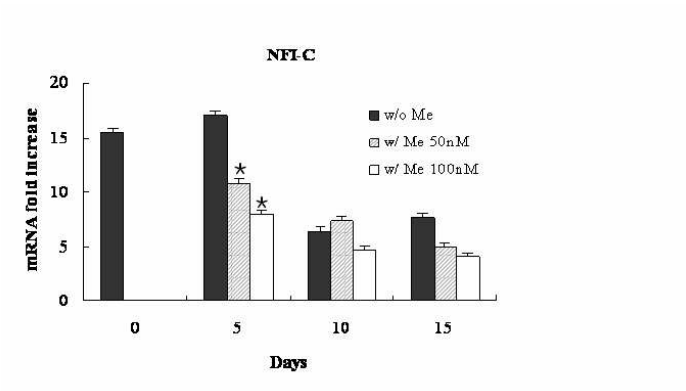
NFI-C
w/o Me
w/ Me 50nM
w/ Me 100nM
mRNA fold increase
20
15
10
5
0
0
5
10
15
Days

Fig. 5.

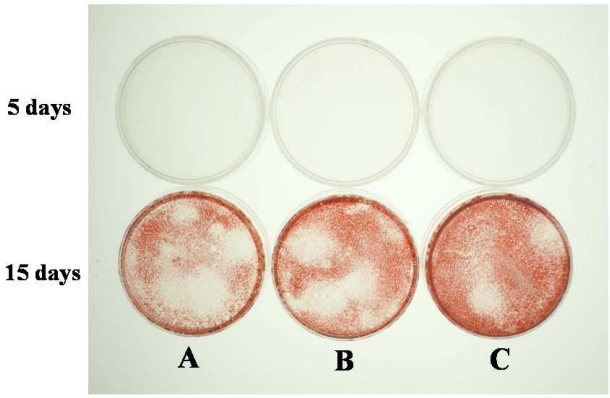

Fig. 6.

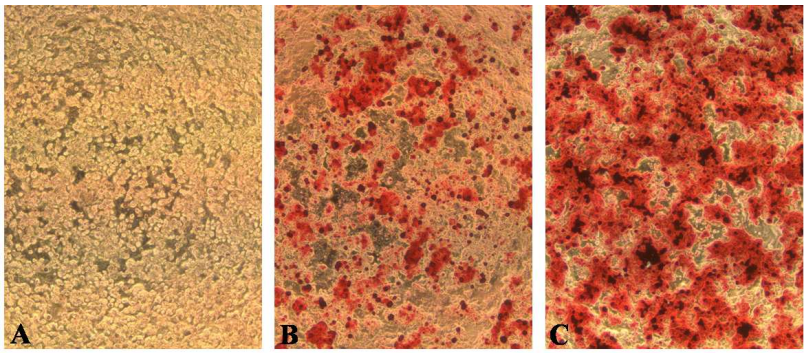

Fig. 7.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20057484	과 정	박사
성 명	한글 : 신인철 영문: Shin, In-Cheol				
주 소	서울시 노원구 공릉3동 312-3				
연락처	E-MAIL:				
논문제목	한글: Melatonin이 MDPC-23 세포의 분화에 끼치는 영향 영문: Effects of Melatonin on MDPC-23 cells Differentiation				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집・형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2006년 12월 일

저작자: 신 인 철 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하