

2010년 8월

석사학위 논문

TGF- β 1에 의해 유도되는
HSP27이 생쥐 치유두 유래
MDPC-23 세포 이동에 미치는
역할

조선대학교 대학원
치의생명공학과
권 성 민

TGF- β 1에 의해 유도되는
HSP27이 생쥐 치유두 유래
MDPC-23 세포 이동에 미치는
역할

2010년 8월 25일

조선대학교 대학원
치의생명공학과
권 성 민

TGF- β 1에 의해 유도되는
HSP27이 생쥐 치유두 유래
MDPC-23 세포 이동에 미치는
역할

지도교수 안상건

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2010년 5월

조선대학교 대학원
치의생명공학과
권성민

권성민의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 윤정훈 (인)

위원 조선대학교 교수 김학균 (인)

위원 조선대학교 교수 안상건 (인)

2010년 5월

조선대학교 대학원

목 차

목 차	i
도목차	iii
ABSTRACT	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료 및 항체	4
2. 세포 배양	4
3. MTT 분석	4
4. 세포 이동 분석	5
5. Western blot 분석	5
6. 자료 분석	6
III. 결과	7
1. TGF- β 1이 MDPC-23 세포 증식에 미치는 영향	7
2. TGF- β 1이 MDPC-23 세포 이동에 미치는 영향	8
3. TGF- β 1이 p38 MAPK/Hsp27의 인산화에 미치는 영향	9
4. TGF- β 1이 integrin β 1/Akt의 활성화에 미치는 영향	10
5. Hsp27활성 억제가 TGF- β 1에 의해 유도되는 MDPC-23 세포 이동에 미치는 영향	12
6. TGF- β 1에 의해 활성화된 p38 MAPK가 Hsp27의 인산화에 미치는 영향.....	14

7. p38 MAPK 저해제가 TGF- β 1에 의해 유도된 MDPC-23 세포의 이동에 미치는 영향	16
8. TGF- β 1에 의해 유도된 MDPC-23의 세포 이동 기전 모델	17
IV. 고찰	18
V. 참고문헌	21

도목차

Figure 1. The effect of TGF- β 1 on cell proliferation of MDPC-23 cells	7
Figure 2. The effect of TGF- β 1 on migration of MDPC-23 cells	8
Figure 3. The effect of TGF- β 1 on the phosphorylation of p38 MAPK and Hsp27 in MDPC-23 cells	9
Figure 4. The effect of TGF- β 1 on the Integrin β 1/Akt signaling in MDPC-23 cells	11
Figure 5. The effect of Hsp27 on TGF- β 1-induced migration.	12
Figure 6. The effect of p38 MAPK inhibition on TGF- β 1-induced migration	15
Figure 7. The effect of Hsp27 and p38 MAPK inhibition on TGF- β 1-induced migration	16
Figure 8. Model of TGF- β 1-mediated cell migration in mouse dental papilla derived MDPC-23 cells	17

ABSTRACT

Transforming growth factor $\beta 1$ -induced heat shock protein 27 promotes migration of mouse dental papilla derived MDPC-23 cells

Kwon Seong Min

Advisor : Prof. Sang-Gun Ahn, PhD

Department of Dental Bioengineering,

Graduate School of Chosun University

Introduction: Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) regulates cellular function including cell growth, differentiation, angiogenesis, migration and metastasis. However, signal transduction pathways of TGF- $\beta 1$ are mostly undefined in mouse dental papilla derived MDPC-23 cells. In this study, we investigated TGF $\beta 1$ -induced migration focusing on heat shock protein 27 (Hsp27) activation.

Methods: Cellular response by TGF $\beta 1$ in MDPC-23 cells was measured by Western blot and immunocytochemistry assay. Cell migration was determined by counting migrated cells using Chemotaxis Cell Migration

Assay kit.

Results: TGF β 1 induced cell migration and increased the phosphorylation of Hsp27 and p38 MAPK in MDPC-23 cells. However, TGF- β 1 did not affect Akt/NF- κ B signaling to regulate migration of MDPC-23 cells. Inhibiting p38 MAPK with SB203580 blocked TGF β 1-induced Hsp27 activation and cell migration.

Conclusion: Hsp27 phosphorylation followed by p38 MAPK activation was required for TGF β 1-induced migration and Hsp27 itself contributed to MDPC-23 cell migration.

I. 서론

Transforming growth factor β (TGF- β)는 다양한 기능을 하는 cytokine 으로, 세포 성장 및 이동, 분화, apoptosis, 부착, 신생 혈관 형성 및 면역반응 등 세포내 다양한 기능을 조절한다¹⁻³⁾.

TGF- β s는 insulin-like growth factors, Bone morphogenetic protein (BMPs)을 포함한 다양한 angiogenic factors들과 함께 상아기질에 존재하며, 이러한 성장인자들은 세포 손상 후 상아질-치수 복합체 (dentin-pulp complex) 수복시 세포 신호기전에 관여한다. 또한 TGF- β s는 치수에서 조직 수복 및 상아기질 분비를 자극하고, 상아모세포 분화를 돋는다. 최근 연구에서 TGF- β 는 악성 종양과 평활근 세포 (smooth muscle cells)에서 PI3 kinase와 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK, ERK)를 조절함으로써 세포 이동과 전이를 조절한다고 알려져 있다^{4,5)}. 이 중, TGF- β 1은 폐에서 세포외 기질 (extracellular matrix)의 부산물로, integrin 수용체 (receptors) : α 3 β 1, α v β 3와 α v β 5를 통해 integrin과 상호작용을 함으로써 세포 부착과 이동을 조절한다고 보고되었다⁶⁻¹⁰⁾. 또한, TGF- β 1은 전이성 암의 말기 단계에서 종양 세포의 이동과 성장을 촉진한다고 알려졌으며^{11,12)} 반면, 유방암 세포에서 TGF- β 1은 FAK와 integrin의 상호관계를 통해 세포 이동이 증가한다고 보고되었다¹³⁾.

이 밖에도 TGF- β 1은 치수줄기 세포에서 TGF- β type II 수용체를 활성화시키고, 두 종류의 다른 TGF- β type I 수용체가 활성화됨으로써, 세포질의 Smads 단백질의 신호를 통해 초기의 상아질발생 과정에서 상아질 기질 단백질의 분비를 유도한다^{14,15)}.

Heat shock proteins (HSPs)은 분자량에 따라 Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60와 low molecular weight Hsp family로 분류한다. 이러한 HSPs는 heat shock을 비롯하여 산화적 스트레스, 중금속, 바이러스 감염 등 다양한

스트레스 조건에서 발현이 증가함으로써, 스트레스로부터 세포를 보호하는 기능을 할 뿐만 아니라, 정상 세포 성장 과정에서 일어나는 단백질의 folding, 이동 및 분해 등에 중요한 역할을 한다. 대부분의 HSP들의 발현은 Heat shock transcription factor (HSF)라 불리는 전사조절인자에 의해 조절된다¹⁶⁾. 외부 스트레스로부터 증가된 Hsp27은 heat shock 또는 산화적 스트레스에 의해 유도되는 apoptosis를 억제한다고 보고되었다¹⁷⁻¹⁹⁾. 반면, Hsp27의 발현은 전립선, 유방, 신장, 난소를 포함한 다양한 종양에서 비정상적으로 증가하며, 종양 세포의 방사선 및 항암치료로부터 생존율을 높이는 역할을 한다²⁰⁻²³⁾. 또한 세포사 기전에서 Hsp27은 pro-apoptotic 단백질의 binding을 통해 활성을 억제함으로써 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 예컨대, Hsp27은 pro-caspase-3와 binding 하여, 성숙 분열 (maturation)을 억제하며²⁵⁾, cytochrome c와 binding함으로써, apoptosome 형성을 억제한다. 또한, Hsp27은 Bax와 binding함으로써, apoptosis동안 mitochondria로의 translocation을 저해하며, PI3 kinase activity의 활성화를 유도하고, 그 결과로, Akt 인산화를 통해 세포 생존 신호경로를 높인다²⁶⁾.

이전 연구에서, Hsp27은 치아 발생 과정에서 상아모세포, 법랑모세포에서 발현한다고 보고되었으며^{27,28)}, 치수세포의 분화과정에 관여한다는 보고가 있었다²⁹⁾.

치수 세포는 상아질-치수 복합체 재생에 중요한 역할을 하며 이 과정의 초기 단계에서 세포 이동은 중요한 현상이다³⁰⁾. 이러한 세포 이동은 신생혈관형성, 염증반응, 조직 발생, 상처 치유 그리고 악성 종양의 전이를 포함한 다양한 병리학적 상태에서 중요한 역할을 한다. 또한 세포 이동은 사람의 악성 종양 세포에서 β 1 integrin, Akt, ERK 그리고 NF-kappaB-dependent 경로와 같은 여러 종류의 신호를 통하여 조절된다고 알려져 왔다^{12,31)}.

일부 몇몇의 악성 종양 세포에서 세포 이동에 관한 TGF- β 1과 Hsp27의 역할에 대한 연구가 이루어졌지만, 치수 또는 상아모세포와 같은 특징을 가진 세포에서의 세포 이동에 대한 역할은 보고된 바 없다.

따라서 이 연구에서, 생쥐 치유두에서 유래된 MDPC-23 세포에서 TGF- β 1이 세포 이동에 영향을 미치는지 조사하였으며, p38 MAPK과 Hsp27 활성화가 세포 이동에 영향을 미치는지 확인하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1) 재료 및 항체

Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)은 R&D System (Minneapolis, MN)으로부터 구입하였고, p38 MAPK inhibitor인 SB203580는 Sigma - Aldrich Corporation (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 일차 항체는 mouse anti-p38MAPK monoclonal antibody; anti-phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr182) polyclonal antibody; anti-Hsp27 monoclonal antibody; anti-phospho-Hsp27 (Ser82) polyclonal antibody (Santa cruz, CA)를 사용하였다.

2) 세포 배양

18-19일 된 CD-1 생쥐 치유두에서 유래된 MDPC-23 세포주를 사용하였다³²⁾. MDPC-23 세포는 10% fetal bovine serum, 1 x MEM non-essential amino acid, 100 U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin으로 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에서 37 °C, 5 % CO₂의 조건하에 계대 배양하였다.

3) MTT 분석

MTT 시약은 Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide를 최종 농도 5 mg/ml 가 되도록 PBS에 녹인 후 빛을 차단하고 4°C에 보관하였다. MDPC-23 세포 주를 계수하여 12 well 배양접시에 1×10^5 개씩 넣고 배양하였다. TGF- β 1을 처리 후, MTT 용액을 넣고, 37 °C에서 3 시간을 배양하였다. 세포 배양액을

제거한 후, acid-isopropanol (0.04 mol/L HCL in isopropanol)을 분주하고 dark blue crystals을 용해시킨다. 용해된 용액을 96 well plate로 옮긴 후, Microplate Autoreader ELISA를 사용하여 570 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

4) 세포 이동 분석

세포 이동 분석은 Chemotaxis Cell Migration Assay kit (CHEMICON)를 사용하여 확인하였다. MDPC-23 세포를 계수하여 Migration kit에 1×10^4 개씩 넣고 37 °C, 5 % CO₂의 조건하에 24시간 배양하였다. Lower surface membrane에 이동된 세포를 methanol로 고정 후, hematoxylin을 사용하여 5분동안 염색하였다. Olympus BX41 inverted microscope를 사용하여 사진을 찍고, 이동된 세포수를 측정하였다. 그리고, 이동된 세포는 cell lysis buffer로 lysis 후, CyQUANT GR Dye를 사용하여, fluorescence palte reader (Varioskan, Thermo Electron Co, Waltham, MA, USA)로 480/520 nm의 파장에서 확인하였다.

5) Western blot 분석

단백질의 분리를 위해 Lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA와 protease inhibitors)를 사용하여 단백질을 추출한 후, Micropalte Autoreader를 사용하여 595 nm에서 농도를 측정하였으며, 50 µg의 단백질을 7.5-12% SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동 후, PVDF membrane을 이용해 transfer를 시행하였다. 일차 항체는 1:1000으로 희석하여 사용하였고, 대조군으로 Actin 단백질을 사용하였다. 단백질 발현 확인은 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce)를 사용하였다.

6) 자료 분석

모든 통계학적 분석은 Microsoft Excel을 사용하였다. 각각 시료에 대한 t-test를 사용하여 유의성 검정을 한 결과 p-value는 <0.01으로 통계적으로 유의하게 정의하였다.

III. 결론

1) TGF- β 1이 MDPC-23 세포 증식에 미치는 영향

TGF- β 1이 MDPC-23 세포의 성장 및 증식을 유도하는지 확인하기 위해 MTT 분석을 시행하였다. MDPC-23 세포를 1×10^5 개씩 넣고 배양하고, TGF- β 1 1 ng/ml을 24, 48시간 처리 후, MTT 용액을 넣고, 37 °C에서 3 시간을 배양하였다. 세포 배양액을 제거한 후, acid-isopropanol (0.04 mol/L HCL in isopropanol)을 분주하고 dark blue crystals을 용해시키고, 용해된 용액을 96 well plate로 옮긴 후, Microplate Autoreader ELISA를 사용하여 570 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 24시간과 48시간에서 대조군과 비교하여 TGF- β 1은 MDPC-23 세포의 세포 성장 및 증식에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 1).

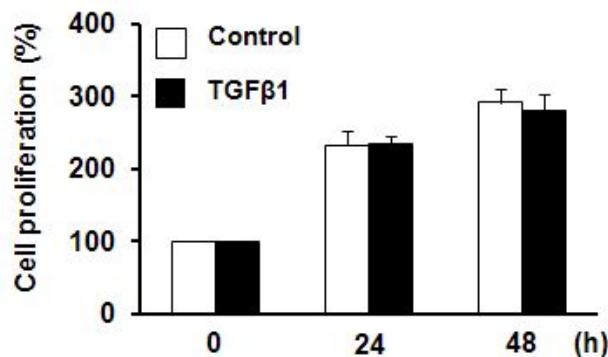


Figure 1. The effect of TGF- β 1 on cell proliferation of MDPC-23 cells. MDPC-23 cells were incubated with 1 ng/ml of TGF- β 1 for 24 or 48 h. Cell proliferation was analyzed by MTT assay.

2) TGF- β 1이 MDPC-23 세포 이동에 미치는 영향

TGF- β 1이 MDPC-23 세포의 세포 이동을 유도하는지 확인하기 위해 세포 이동 분석을 시행하였다. MDPC-23 세포를 계수하여 1×10^4 개씩 넣고 37 °C, 5 % CO₂의 조건하에 TGF- β 1 1 ng/ml을 24시간 처리하여 배양하였다. Lower surface membrane에 이동된 세포를 methanol로 고정 후, hematoxylin을 사용하여 5분동안 염색하였다. Olympus BX41 inverted microscope를 사용하여 사진을 찍고, 이동된 세포수를 측정하였다. 실험 결과, TGF- β 1 24시간 처리군에서 대조군과 비교하여 중요하게 MDPC-23 세포의 세포 이동을 유도하는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

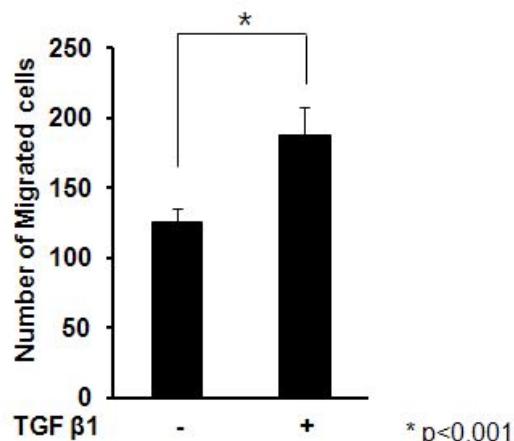


Figure 2. The effect of TGF- β 1 on migration of MDPC-23 cells. MDPC-23 cell migration induced by TGF- β 1 (1 ng/ml) was measured by transwell assay. The graph represents the relative number of cells from three separated experiments. * p-value <0.001, statistically significant when compared with the control.

3) TGF- β 1의 MDPC-23 세포에서 p38 MAPK/Hsp27의 활성화에 미치는 영향

TGF- β 1이 p38 MAPK/Hsp27 신호 경로를 통해 MDPC-23 세포의 이동에 영향을 미치는지 western blot analysis를 통해 확인하였다. TGF- β 1 1 ng/ml 처리 후, 단백질의 분리를 위해 Lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA와 protease inhibitors)를 사용하여 단백질을 추출한 후, Micropalte Autoreader를 사용하여 595 nm에서 농도를 측정하였으며, 50 μ g의 단백질을 12% SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동 후, PVDF membrane을 이용해 transfer를 시행하였다. Hsp27, phospho-Hsp27, phospho-p38과 Actin 항체는 1:1000으로 비율로 사용하였다. 단백질 발현 확인은 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce)를 사용하여 시간별로 확인한 결과, Hsp27의 발현은 TGF- β 1에 의해 변화가 없었고, 6시간 후부터 Hsp27의 인산화가 유도되었으며, 24시간까지 인산화 되었다. 또한 Hsp27의 up-stream인 p38 MAPK의 인산화 역시 6시간부터 유도되었다 (Fig. 3).

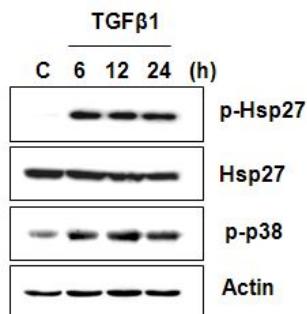


Figure 3. The effect of TGF- β 1 on the phosphorylation of p38 MAPK and Hsp27 in MDPC-23 cells. Cells were treated with 1 ng/ml of TGF- β 1 for the indicated time. Western blot analysis of p38 MAPK/Hsp27 phosphorylation.

4) TGF- β 1의 MDPC-23 세포에서 integrin β 1/Akt의 활성화에 미치는 영향

기존 다른 연구에서 TGF- β 1이 FAK, Akt, NF- κ B, integrin 신호 경로를 통해 세포 이동이 증가된다는 보고가 있다^{12,30)}. 따라서 MDPC-23 세포에서 TGF- β 1에 의한 integrin β 1/Akt signaling에 영향을 미치는지 확인하기 위해 Western blot analysis를 수행하였다. TGF- β 1 1 ng/ml 시간별 처리 후, 단백질의 분리를 위해 Lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA와 protease inhibitors)를 사용하여 단백질을 추출한 후, Micropalte Autoreader를 사용하여 595 nm에서 농도를 측정하였으며, 50 μ g의 단백질을 7.5, 10 % SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동 후, PVDF membrane을 이용해 transfer를 시행하였다. integrin β 1, phospho-FAK, phospho-ERK, phospho-Akt, phospho-I- κ B α 와 Actin 항체을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, integrin β 1을 매개로 하는 세포 이동 기전에는 변화가 없었으며, FAK, Akt와 I- κ B를 포함한 integrin β 1 downstream에도 영향을 미치지 않았다. (Fig. 4)

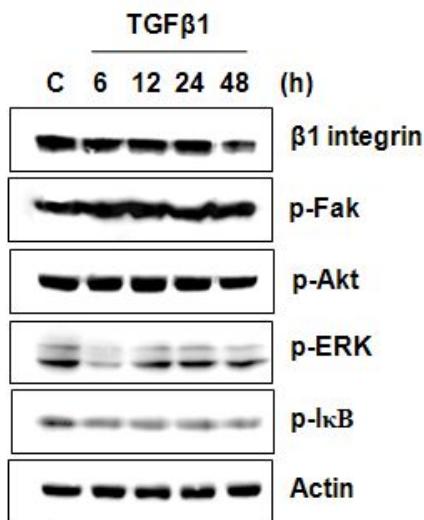


Figure 4. The effect of TGF- β 1 on the Integrin β 1/Akt signaling in MDPC-23 cells. Cells were treated with 1 ng/ml of TGF- β 1 for the indicated time. Integrin β 1/Akt signaling on TGF- β 1 treated MDPC-23 cells.

5) Hsp27의 억제가 TGF- β 1에 의해 유도되는 MDPC-23 세포 이동에 미치는 영향

Hsp27-특이 항체를 사용하여 TGF- β 1에 의해 유도되는 MDPC-23 세포의 이동에 영향을 미치는지 알아보았다. MDPC-23 세포를 계수하여 Migration kit에 1×10^4 개씩 넣고 37°C , 5 % CO₂의 조건하에 대조군과 TGF- β 1 1 ng/ml을 24시간 처리하여 배양하고, Hsp27-특이 항체 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 TGF- β 1 1 ng/ml을 24시간 처리 후, Lower surface membrane에 이동된 세포를 methanol로 고정 후, hematoxylin을 사용하여 5분동안 염색하였다. Olympus BX41 inverted microscope를 사용하여 사진을 찍고, 이동된 세포수를 측정하였다. 그 결과, Hsp27 항체를 처리함으로써 TGF- β 1에 의해 유도되는 세포 이동이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 이 결과로 MDPC-23 세포에서 TGF- β 1에 의해 유도되는 세포 이동이 Hsp27를 통해 이루어진다는 것을 확인하였다.

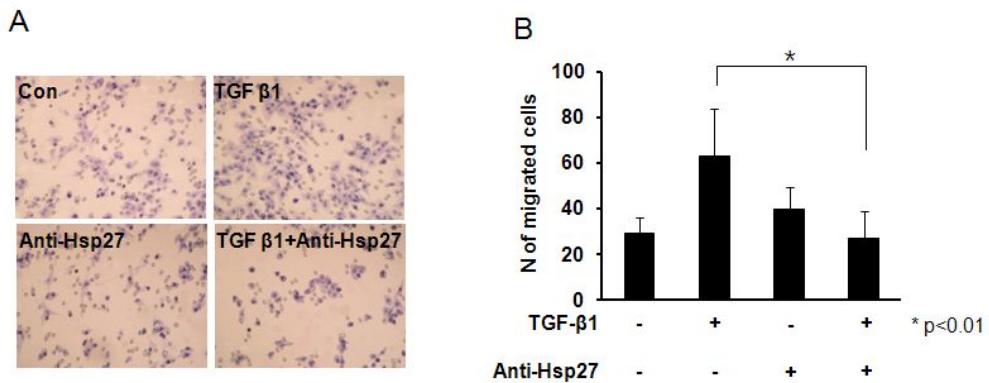


Figure 5. The effect of Hsp27 on TGF- β 1-induced migration. MDPC-23 cells were incubated with or without TGF- β 1 (1 ng/ml) and Hsp27 antibody (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. (A) Migrated cells were counted by

transwell assay. (B) Cell migration was quantified by counting the number of cells that migrated into the inner membrane. The graph represents the relative number of cells from three separated experiments. * p-value <0.01, statistically significant.

6) TGF- β 1에 의해 활성화된 p38 MAPK가 Hsp27의 인산화에 미치는 영향

이전의 연구에서, p38 MAPK가 Hsp27 인산화를 통해 활성화를 조절한다고 알려졌다. p38 저해제를 이용하여 Hsp27 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. TGF- β 1 처리 전에 p38 MAPK 저해제인 SB203580을 10 μ M, 1시간 전처리 후, 단백질의 분리를 위해 Lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA와 protease inhibitors)를 사용하여 단백질을 추출한 후, Micropalte Autoreader를 사용하여 595 nm에서 농도를 측정하였으며, 50 μ g의 단백질을 12% SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동 후, PVDF membrane을 이용해 transfer를 시행하였다. Hsp27, phospho-Hsp27, p38, phospho-p38을 이용하여 Hsp27의 인산화와 p38 MAPK 활성화를 확인하였다. Western blot 분석을 통해 24시간에서 대조군과 비교하여 Hsp27의 발현과 p38의 발현은 차이가 없었으며, SB203580이 TGF- β 1에 의해 유도되는 p38 MAPK 인산화를 억제하는 것을 확인하였고, SB203580에 의해 Hsp27의 인산화 역시 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 6).

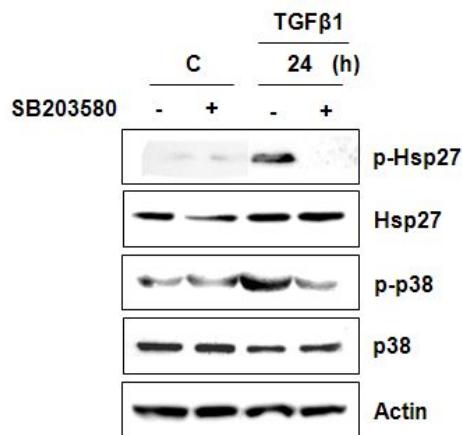


Figure 6. The effect of p38 MAPK inhibition on TGF- β 1-induced migration. MDPC-23 cells were pretreated with p38 MAPK inhibitor, SB203580 (10 μ M), for 1 h and then treated TGF- β 1 (1 ng/ml) for 24 h.

7) p38 MAPK 억제가 TGF- β 1에 의해 유도된 MDPC-23 세포의 이동에 미치는 영향

MDPC-23 세포를 계수하여 Migration kit에 1×10^4 개씩 넣고 37 °C, 5 % CO₂의 조건하에 TGF- β 1 처리 전에 p38 MAPK 저해제인 SB203580을 10 μ M, 1시간 전처리 후, 24시간 배양하였다. Lower surface membrane에 이동된 세포수를 측정하여 세포 이동 분석을 시행하였다. 그 결과, 24시간에서 대조군과 비교하여 MDPC-23 세포에서 SB203580이 TGF- β 1에 의해 유도되는 세포 이동을 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 7). 이로써, MDPC-23 세포에서 TGF- β 1에 의해 유도되는 p38 MAPK의 활성화가 Hsp27 인산화를 유도하여 세포 이동을 매개함을 확인하였다.

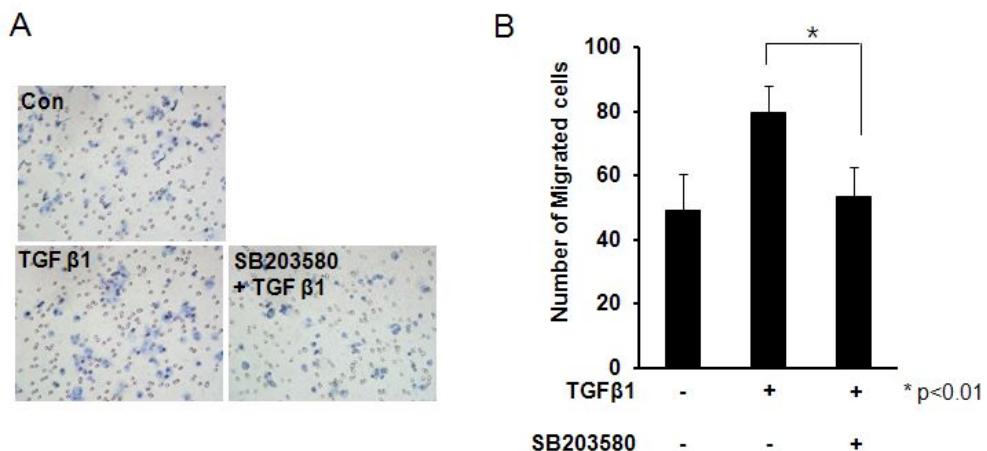


Figure 7. The effect of Hsp27 and p38 MAPK inhibition on TGF- β 1-induced migration. (A) Migrated cells were counted by transwell assay. (B) Cell migration was quantified by counting the number of cells that migrated into the inner membrane. The graph represents the relative number of cells from three separated experiments.

* p -value <0.01 statistically significant.

8) TGF- β 1에 의해 유도된 MDPC-23의 세포 이동 기전

이전 보고에 의하면, 종양세포 내에서 TGF- β 1 signaling^o TGF- β 1 수용체를 통하여, Akt, I- κ B α 의 인산화를 통해 NF- κ B p65의 인산화, integrin을 통한 세포 이동에 영향을 미친다고 알려져 있지만, 생쥐 치유두에서 유래된 MDPC-23세포에서는 integrin signaling보다는 p38 MAPK 인산화가 Hsp27이 인산화를 유도함으로써 세포 이동에 영향을 미친다는 결론을 얻었다.

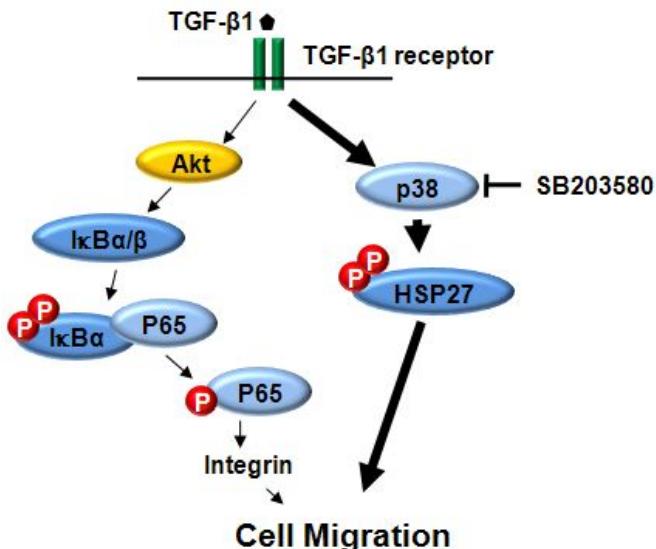


Figure 8. Model of TGF- β 1-mediated cell migration in mouse dental papilla derived MDPC-23 cells. Regulation of cell migration and phosphorylation of Hsp27 and p38 MAPK by TGF- β 1. See “Discussion” for additional details.

IV. 고찰

TGF- β 는 세포외 기질의 생합성의 중요한 매개체로서, 세포 성장과 분화, 세포 이동에 관여한다고 알려져 왔다^{1-3,33)}. 상아모세포의 분화와 상아질 석회화를 비롯한 상아질 형성과정에서 TGF- β 1의 역할은 잘 알려져 왔고^{11,12)}, 최근 연구에서, TGF- β 1은 MAPK, matrix metalloproteinases (MMPs), cathepsins과 Smad2/3 pathway를 통해 치수 세포의 분화와 성장을 조절한다고 보고되었다^{14,15,34,35)}. 또한, TGF- β 2는 MEK/ERK1/2와 ALK5/Smad2/3 pathway의 활성화를 통해 분화 과정의 특정단계에서 치수의 기능을 조절한다고 알려졌다³⁶⁾.

여러 연구에서 TGF- β 에 의해 조절되는 세포내 생리학적 과정에서 Hsp27과 직·간접적으로 관련되어 있다고 보고되었다. 예컨대, 위암 세포에서 TGF- β 1과 관련하여 Hsp27의 발현이 침윤과 전이를 강하게 유도하며³⁷⁾, Hatakeyama 등은 osteoblast-like cells에서 TGF- β 자극에 의한 Hsp27의 유도가 세포성장과 관련되어 있다고 하였다³⁸⁾. 그러나, 생쥐 치유두에서 유래된 MDPC-23세포에서 TGF- β 1에 의한 Hsp27의 기능에 대한 기전은 아직 알려져 있지 않다. 이 연구에서는, 생쥐 치유두에서 유래된 MDPC-23 세포에서 TGF- β 1이 세포 이동에 영향을 미치는지 조사하였으며, TGF- β 1에 의한 p38 MAPK 활성화와 Hsp27의 인산화에 대한 연구를 수행하였다. 연구 결과 TGF- β 1이 MDPC-23 세포의 이동에 영향을 미침을 확인하였으며, TGF- β 1에 의해 유도되는 세포 이동이 Hsp27 특이 항체에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 이는 TGF- β 1에 의해 유도되는 Hsp27의 인산화가 MDPC-23 세포의 이동을 촉진함을 나타낸다.

이전의 연구에서 발생중인 상아모세포와 법랑모세포의 세포 성장과 분화 초기 단계 사이에서 HSP25 (주의 HSP27의 동종 (homologous))의 발현이 switch 역할은 한다고 보고된 바 있다³⁹⁾. 이는 분화전의 상아모세포가 상아질

쪽으로 이동하는데 있어서 Hsp27 단백질의 역할이 중요하다는 가능성을 제시하였다.

또한 이 연구결과에서 MDPC-23 세포에서 TGF- β 1에 의해 유도되는 Hsp27의 인산화가 p38 MAP kinase의 활성화를 통해 이루어진다는 것을 확인하였다. p38 MAPK-specific inhibitor인 SB203580를 이용해 Hsp27의 인산화를 억제하였을 때, TGF- β 1에 의해 유도되는 MDPC-23 세포의 이동이 억제되는 것을 확인하였다. 이들 결과는, 이전에 보고된 p38 MAPK가 Hsp27의 인산화와 혈관 평활근 세포와 간암 세포의 이동에 관련이 되어 있다는 보고와 일치한다^{40,41)}. 그러나, 우리의 결과에서 다른 세포 이동에 관여하는 integrin β 1/Akt signaling의 활성화에는 TGF- β 1이 영향을 미치지 않았다. 결론적으로, TGF- β 1에 의해 유도되는 p38 MAPK/Hsp27 신호 경로로 MDPC-23 세포의 이동에 중요한 역할을 할 것이라는 결론을 얻을 수 있었다 (Fig. 8).

Hsp27은 molecular chaperones으로써 스트레스 조건에서의 생존율 증가시키는 데에 관여하여, 골모세포에서 열 충격에 의해 Hsp70와 Hsp27이 유도된다고 보고되었다⁴²⁾. 이 연구에서 TGF- β 1에 의해 Hsp27의 인산화된 반면 Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp110와 같은 다른 종류의 Hsps들의 발현은 변화가 없었다 (data not shown). 이러한 결과들로 TGF- β 1에 의해 유도되는 Hsp27의 활성화가 MDPC-23 세포 기능에서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

MDPC-23 세포에서 TGF- β 1이 apoptosis에 영향을 미친다는 보고가 있으나⁴³⁾, 이 연구에서는 TGF- β 1에 의한 세포사는 관찰할 수 없었다. 이는 세포 배양 조건 (혈청 또는 기타 다른 요인)에 따른 차이와 관련이 있을 수 있지만, 아직까지 TGF- β 1에 의해 조절되는 생물학적 영향은 모두 밝혀진 것은 아니다.

상아질발생 과정 동안 TGF- β 1에 의한 분자 메커니즘을 이해하기 위해서는 TGF- β 1에 의해 유도되는 세포 이동에서 MMPs와 같은 migratory factor

들과 Hsp27과의 상관관계에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

1. Ignotz RA, Massague J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell* 51:189–97, 1987.
2. Brenmoehl J, Miller SN, Hofmann C, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol* 15:1431–42, 2009.
3. Yoo KS, Nastiuk KL, Krolewski JJ. Transforming growth factor beta1 induces apoptosis by suppressing FLICE-like inhibitory protein in DU145 prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 124:834–42, 2009.
4. Yeh YY, Chiao CC, Kuo WY, et al. TGF-beta1 increases motility and alphavbeta3 integrin up-regulation via PI3K, Akt and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol* 75:1292–301, 2008.
5. Kim HP, Lee MS, Yu J, et al. TGF-beta1 (transforming growth factor-beta1)-mediated adhesion of gastric carcinoma cells involves a decrease in Ras/ERKs (extracellular-signal-regulated kinases) cascade activity dependent on c-Src activity. *Biochem J* 379:141–50, 2004.
6. LeBaron RG, Bezverkov KI, Zimber MP, et al. Beta IG-H3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor-beta, is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro. *J Invest Dermatol* 104:844–9, 1995.
7. Billings PC, Herrick DJ, Kucich U, et al. Extracellular matrix and nuclear localization of beta ig-h3 in human bladder smooth muscle and fibroblast cells. *J Cell Biochem* 79:261–73, 2000.
8. Kim JE, Jeong HW, Nam JO, et al. Identification of motifs in the

fasciclin domains of the transforming growth factor-beta-induced matrix protein beta IgG -h3 that interact with the alphavbeta5 integrin. *J Biol Chem* 277:46159–65, 2002.

9. Nam JO, Kim JE, Jeong HW, et al. Identification of the alphavbeta3 integrin-interacting motif of beta IgG 3 and its anti-angiogenic effect. *J Biol Chem* 278:25902–9, 2003.
10. Jeong HW, Kim IS. TGF-beta1 enhances beta IgG -h3-mediated keratinocyte cell migration through the alpha3beta1 integrin and PI3K. *J Cell Biochem* 92:770–80, 2004.
11. Lu SL, Reh D, Li AG, et al. Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res* 64:4405–10, 2004.
12. Gold LI. The role for transforming growth factorbeta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 10:303–60, 1999.
13. Wendt MK, Schiemann WP. Therapeutic targeting of the focal adhesion complex prevents oncogenic TGF-beta signaling and metastasis. *Breast Cancer Res* 11:R68, 2009.
14. Hwang YC, Hwang IN, Oh WM, et al. Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *J Mol Histol* 39:153–60, 2008.
15. Hea WX, Niub ZY, Zhao SL, et al. TGF- β activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol* 49:911–8, 2004.
16. Chen Y, Currie RW. Small interfering RNA knocks down heat shock factor-1 (HSF-1) and exacerbates pro-inflammatory activation of NF-kappaB and AP-1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 69:66–5, 2006.

17. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, et al. Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286:433–42, 2001.
18. Stege GJ, Brunsting JF, Kampinga HH, et al. Thermotolerance and nuclear protein aggregation: Protection against initial damage or better recovery? *J Cell Physiol* 164:579–86, 1995.
19. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 274:18947–56, 1999.
20. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, et al. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 60:7099–105, 2000.
21. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, et al. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 79:468–75, 1998.
22. Takashi M, Sakata T, Ohmura M, et al. Elevated concentrations of the small stress protein HSP27 in rat renal tumors. *Urol Res* 25:173–7, 1997.
23. Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, et al. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1:1603–9, 1995.
24. Pandey P, Farber R, Nakazawa A, et al. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19:1975–81, 2000.
25. Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 9:195–201, 2001.
26. Wu R, Kausar H, Johnson P, et al. Hsp27 regulates Akt activation and

- polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *J Biol Chem* 282:21598–608, 2007.
27. Ohshima H, Ajima H, Kawano Y, et al. Transient expression of heat shock protein (Hsp) 25 in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat incisor. *Arch Histol Cytol* 63:381–95, 2000.
28. Ohtsuka Y, Nakakura-Ohshima K, Noda T, et al. Possible role of heat shock protein (Hsp) 25 in the enamel organ during amelogenesis in the rat molar. *Arch Histol Cytol* 64:369–78, 2001.
29. Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Maeda T. Expression of heat-shock protein 25 immunoreactivity in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat molar. *Connect Tissue Res* 43:220–3, 2002.
30. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, et al. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 39:273–80, 1995.
31. Wei YY, Chen YJ, Hsiao YC, et al. Osteoblasts-derived TGF- β 1 enhance motility and integrin upregulation through Akt, ERK, and NF- κ B-dependent pathway in human breast cancer cells. *Mol Carcinog* 47:526–37, 2008.
32. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 37:233–49, 1998.
33. Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci* 106:179–84, 1998.
34. Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF- β 1. *J Dent Res* 79:77–84, 2000.
35. Tai TF, Chan CP, Lin CC, et al. Transforming growth factor beta2

regulates growth and differentiation of pulp cells via ALK5/Smad2/3. *J Endod* 34:427–32, 2008.

36. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 37:233–49, 1998.
37. Wang K, Li J, Zhen C, et al. Enhanced invasive and metastatic potential induced by transforming growth factor-beta1 might be correlated with glutathione-S-transferase-pi, cofilin and heat shock protein 27 in SGC-7901 gastric cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 39:520–6, 2007.
38. Hatakeyama D , Kozawa O , Niwa M, et al. Upregulation by retinoic acid of transforming growth factor-L-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblasts: involvement of mitogen-activated protein kinases. *Biochim Biophys Acta* 1589:15–30, 2002.
39. Nakasone N, Yoshie H, Ohshima H. An immunohistochemical study of the expression of heat-shock protein-25 and cell proliferation in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in rat molars. *Arch Oral Biol* 51:378–86, 2006.
40. Chen HF, Xie LD, Xu CS. The signal transduction pathways of heat shock protein 27 phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 333:49–56, 2010.
41. Guo K, Liu Y, Zhou H, et al. Involvement of protein kinase C beta-extracellular signal-regulating kinase 1/2/p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 activation in hepatocellular carcinoma cell motility and invasion. *Cancer Sci* 99:486–96, 2008.
42. Shakoori AR, Oberdorf AM, Owen TA, et al. Expression of heat shock genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *J Cell Biochem* 48:277–87, 1992.
43. He WX, Niu ZY, Zhao SL, et al. Smad protein mediated transforming

growth factor beta1 induction of apoptosis in the MDPC-23 odontoblast-like cell line. Arch Oral Biol 50:929–36, 2005.