

치아 발생과정 중 각 시기와 치아부위에 따른 주요 유전자의 발현 양의 비교

연세대학교 치과대학 구강생물학교실, BK21 치의과학 사업단,
구강악안면경조직 재생연구센터, 구강과학연구소

이종민, 조성원, 박성욱, 정희선, 정한성*

I. 서 론

생쥐의 치아 발생은 형태적 변화, 법랑결절(enamel knot)의 유전자 조절, 유전자의 발현 양상, 그리고 유전자들 간의 상호작용 등에 관하여 다양하게 연구되고 있다.¹⁻⁴⁾ 또한 이러한 치아 발생에 있어서 상피와 간엽 조직간의 상호작용이 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다.¹⁻⁹⁾ 유전자간의 상호작용은 각 유전자의 발현 양과 매우 밀접한 연관이 있다. 그러므로 유전자의 발현 양을 관찰하는 것은 유전자간의 연관성과 그 기능을 추측하는데 매우 유용한 실험 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다. 나아가 시간에 따른 유전자의 발현양의 확인은 각 시기별 치아발생에 특정유전자가 영향을 미치는지에 대한 지표로 사용될 수 있을 것이다.

치아발생과 연관이 있다고 알려져 있는 유전자의 수는 300여 개에 달하고 있으며⁵⁾ 치아발생과정 중 앞니(incisor), 치간극(diastema), 어금니(molar)의 발생에 각각 다른 유전자가 중요하게 작용한다는 사실이 알려져 있다. 실 예로 치아썩을 제외배양 시 Noggin을 처리한 후 앞니가 어금니의 형태를 띤다는 사실이 보고되어 있다.¹⁰⁾ 이 외에도 *Fgf8*, *Bmp4*, *Lhx6*, *Pax9*,

Barx1, *Msx1*, *Msx2*, *Shh*, *Ptc*, *Gli3*, *Lef1*, *Activin-ba* 등의 많은 유전자들이 앞니, 치간극, 그리고 어금니 발생 중 각각의 조직과 시기에서 발현되면서 정상 발생을 조절한다는 사실이 알려져 있다.⁹⁻¹⁶⁾

Bmp4, *Msx1*, *Msx2* 등은 앞니 발생과정 중 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 *Barx1*, *Fgf8* 등은 어금니의 발생에 있어, *Shh*, *Ptc*, *Lhx6* 등은 앞니와 어금니에 동시에 발현되며 치아의 패턴형성(pattern formation)에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹⁶⁾ 이처럼 중요한 치아썩의 각 시기에 따른 유전자의 발현양은 아직 구체적이고 수치화된 데이터가 제공된 적이 없다.

최근 들어 많은 연구에서 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) 기법을 통하여 특정 유전자의 발현 양이 폐와 신장 등 다양한 조직과 시기 별로 측정하여 구체적인 데이터를 제공하고 있다.^{17, 18)} 그리하여 본 연구에서는 위에서 언급한 치아발생 과정 중 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 12가지의 유전자의 발현 양을 측정하였다. 측정은 배아시기 10.5 (판시기), 13.5 (썩시기), 14.5 (모자시기), 16.5 (종시기)로 나누고 또한 앞니, 치간극, 어금니 부위로 나누어 real-time PCR을 통하여 확인하였다. 이러한 수치화 된 데이터를 각각 비교 분석함으로써 치아 발생 중 각 시기별 위치 별 유전자들간

* 교신저자.

** 본 연구는 서울시 산학연 협력사업(NT070139)의 지원을 받았음.

의 발현양의 변화 추이와 상관 관계를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험대상

성체 ICR mouse는 항온 (22℃)이 유지되고 상대습도가 55%인 동물실에 인공조명 (오전 5시부터 오후 5시까지)하에서 음식과 물에 대한 자유로운 접근이 가능하도록 하였다. 배아는 시기를 맞추어 임신한 ICR mouse에서 채취하였다. 배아기 0 (embryonic day 0; E0)는 vaginal plug가 확인되기 시작한 날로 정하고 E10.5, 13.5, 14.5, 16.5 시기의 배아를 실험용으로 사용

하였다. 각각의 실험당 최소 10개 이상의 배아를 이용하였다.

2. Real-time quantitative PCR

RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 각 시기로 분리된 치아쌍의 total RNA를 분리하여 M-MuLV (New England BioLabs)를 이용하여 역전사 시켜 cDNA를 얻었다. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)은 Thermal Cycler Dice[™] Real Time System (TP800, Takara)과 SYBR Premix EX Taq[™] (Takara)을 사용하였으며 Cycler Dice[™] Real Time System analysis software (Takara)를 사용하여 결과를 분석하였다. RT-qPCR결과는 GAPDH로 normalization 하였다.

Table 1. Primer sequence (F: forward, R: reverse)

Primer	Sequence
<i>GAPDH</i>	F: 5' -CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3' R: 5' -ACCAGGAAATGAGCTTGACAAA-3'
<i>Fgf8</i>	F: 5' -CATCCGGACCTACCAGCTCTACA-3' R: 5' -AGTATCGGTCTCCACAATGAGCTTC-3'
<i>Bmp4</i>	F: 5' -TGATACCTGAGACCGGGAAG-3' R: 5' -AGCCGGTAAAGATCCCTCAT-3'
<i>Lhx6</i>	F: 5' -GCCCGATGTACTGAAGCATGA-3' R: 5' -CCAAGCTCTGCGTCTGACTGA-3'
<i>Pax9</i>	F: 5' -CCGGGTTGGTGTACTGCTCA-3' R: 5' -CCAGTTGGGCTAATTCACGA-3'
<i>Barx1</i>	F: 5' -CGGAGTCGCACCGTATTAC-3' R: 5' -ACGTCTTCACCTGTAAGTGGCTCA-3'
<i>Msx1</i>	F: 5' -TCCTGGGAAAGTCTCTTCAACC-3' R: 5' -GGCAGGACTTGCACAGAGAAAT-3'
<i>Msx2</i>	F: 5' -GCAGAGCCAATAACTGTGAGAGG-3' R: 5' -AGGATGGATGTTGTGGAAAGC-3'
<i>Shh</i>	F: 5' -ATGTTTTCTGGTGATCCTTG-3' R: 5' -TACGTTGGGAATAAACTGCT-3'
<i>Ptc1</i>	F: 5' -CATGCCAGAGACCAGGCTGA-3' R: 5' -GTCTCGTAGGCCGTTGAGGTAGAA-3'
<i>Gli3</i>	F: 5' -TGGACTTGGCACCAATGGAA-3' R: 5' -GGACCCCTGAATCCCTGTACCAC-3'
<i>Lef1</i>	F: 5' -TCACTGTCCAGGCGACACTTC-3' R: 5' -TGAGGCTTCACGTGCATTAG-3'
<i>Activin-βa</i>	F: 5' -GAGGCTGTCAAGAAGCACAT-3' R: 5' -GTGATGATCTCCGAGGTCTG-3'

III. 치아판 시기

(Dental lamina stage; E10.5; Fig. 1)

E10.5인 치아판 시기에서는 치아의 형태가 분명히 보이지 않아 아래턱을 앞니, 치간극, 어금니가 포함된 부분으로 3등분하여 각 유전자의 발현 양을 비교하였다. 이 시기에서 *Fgf8*은 치간극과 어금니부위에 비해 앞니부위에서 약하게 발현되는 것을 확인하였다. 반면에 *Bmp4*는 그 발현 양이 앞니에서 가장 강하게 그리고 어금니부위에서 가장 약하게 발현되었다. *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*의 발현 양은 앞니에서 가장 약하게 발현되었고 어금니에서 가장 강하게 발현되어 *Fgf8*과 비슷한 양상을 보였다. 반면 *Msx1*, *Msx2*는 어금니에서 가장 약하게 발현되고 앞니에서 가장 약하게 발현되는 것을 확인하였다. *Shh*의 경우 앞니에서 강하게 발현되었고 치간극과 어금니에서 비슷한 수준으로 발현되었다. *Shh*의 receptor인 *Ptc*의 발현 양상은 앞니에서 가장 강하게, 어금니에서 가장 약하게 발현된 것을 확인하였다. *Gli3*와 *Activin-ba*는 세 부위 모두 비슷한 양으로 발현되는 양상을 보였다. *Lef1*은 앞니, 치간극, 어금니의 순서로 그 발현 양이 줄어드는 것을 확인하였다.

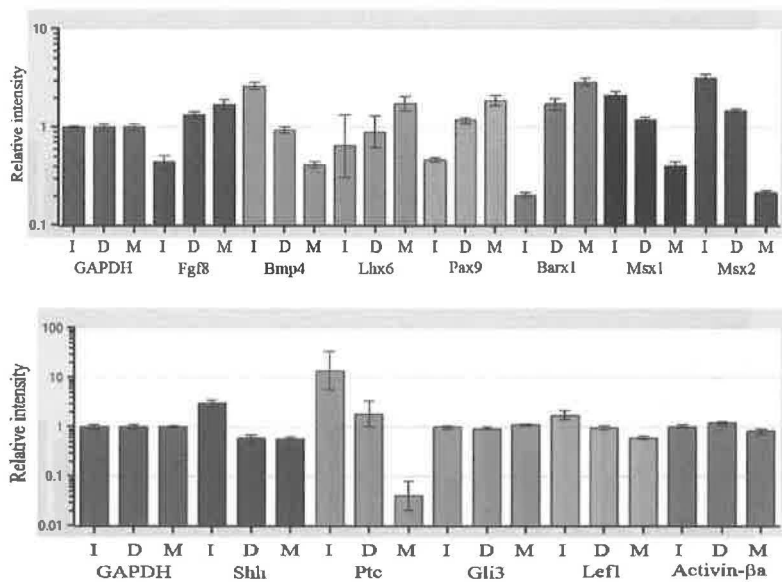


Figure 1. Relative gene expression levels of comparing GAPDH with *Fgf8*, *Bmp4*, *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*, *Msx1*, *Msx2*, *Shh*, *Ptc*, *Gli3*, *Lef1*, *Activin-βa* at E10.5 (I: Incisor, D: diastema, M: molar).

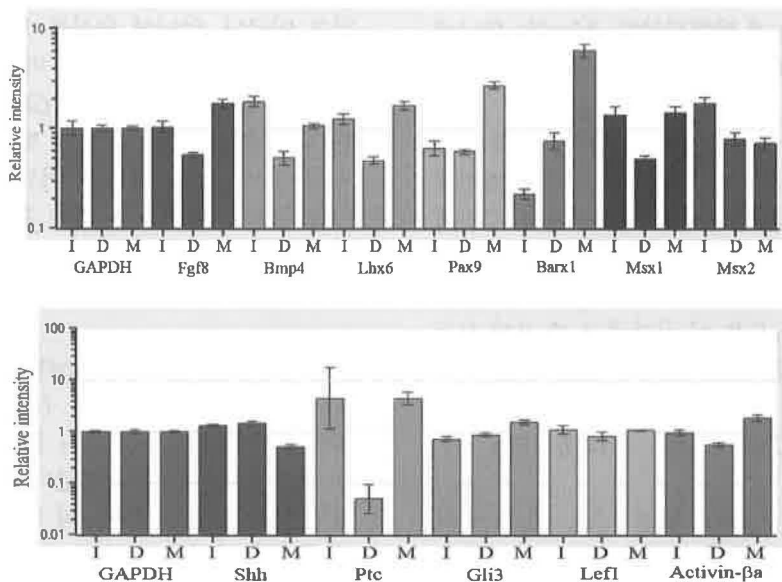


Figure 2. Relative gene expression levels of comparing GAPDH with *Fgf8*, *Bmp4*, *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*, *Msx1*, *Msx2*, *Shh*, *Ptc*, *Gli3*, *Lef1*, *Activin-βa* at E13.5 (I: Incisor, D: diastema, M: molar).

IV. 싹시기 (Bud stage; E13.5; Fig. 2)

E13.5인 싹시기에서 *Fgf8*, *Lhx6*, *Pax9*, *Msx1*의 발현 양이 비슷한 양상을 띠는 것을 확인 하

였다. 이들 유전자는 어금니에서 가장 높게 발현되었으며 치간극에서 가장 낮게 나타났다. *Bmp4*는 앞니에서 높은 양이 발현되는 것으로 확인 되었으며 *Barx1*은 앞니에서 가장 낮게, 어

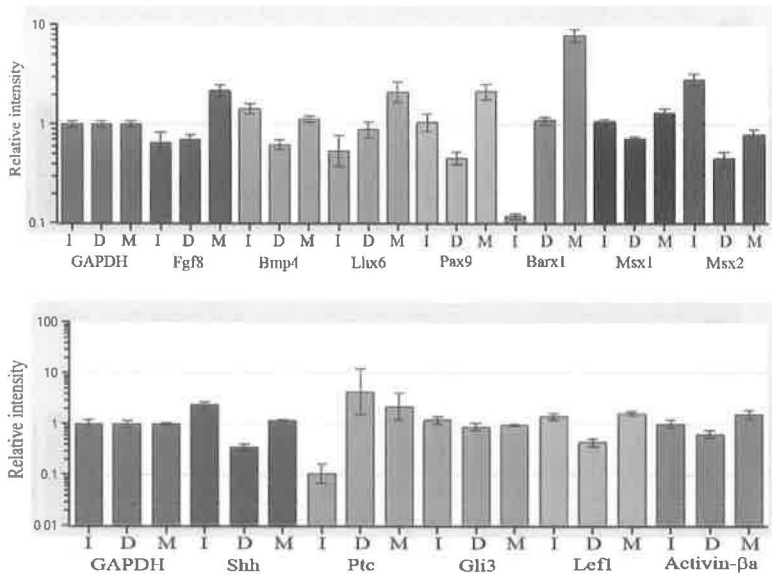


Figure 3. Relative gene expression levels of comparing GAPDH with *Fgf8*, *Bmp4*, *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*, *Msx1*, *Msx2*, *Shh*, *Ptc*, *Gli3*, *Lef1*, *Activin-βa* at E14.5 (I: incisor, D: diastema, M: molar).

금니에서 가장 높게 발현되었다. *Msx2*는 앞니에서 다른 부위에 비해 강하게 발현되는 것을 확인하였다.

*Shh*은 앞니와 치간극에서 비슷하게 강하게 발현되었으며 어금니에서 비교적 약하게 발현되었다. *Ptc*의 발현은 앞니와 어금니에서 강하게 발현되었으며 치간극에서는 매우 약하게 발현되었다. *Gli3*와 *Activin-βa*는 어금니에서 가장 높게 발현되었고 *Lef1*은 이 시기에서 세 부위 모두 비슷한 발현 양을 보였다.

V. 모자시기 (Cap stage; E14.5; Fig. 3)

모자시기에서 *Fgf8*의 발현 양은 어금니에서 앞니와 치간극에 비해 높은 것으로 나타났다. *Bmp4*는 *Msx2*와 비슷하게 앞니에서 높게 나타났고 어금니와 치간극 순으로 점차 약하게 발현되는 것으로 확인되었다. *Lhx6*와 *Barx1*의 발현은 앞니, 치간극, 어금니로 갈수록 그 발현 양이 많은 것을 확인할 수 있었다. *Pax9*과 *Msx1*이 비슷한 양상을 보였으며 어금니에서 가장 강하게, 앞니, 치간극으로 갈수록 약하게 발현되었다.

*Shh*의 발현양은 앞니에서 가장 강하게 발현되

었고 어금니, 앞니의 순서를 보였으며 *Ptc*는 앞니에서 치간극과 어금니에 비해 약하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. *Gli3*의 발현은 세 부위 모두에서 비슷한 양으로 발현 되었으며 *Lef1*과 *Activin-βa*는 앞니와 어금니에서 치간극에 비해 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

VI. 종시기 (Bell stage; E16.5; Fig. 4)

종시기에서 *Fgf8*과 *Bmp4*는 앞니에 강하게 발현되는 것으로 확인되었다. *Lhx6*는 세 부위 모두에서 유의한 차이를 보이지 않았으며 *Pax9*의 경우 치간극과 어금니에서 앞니에 비해 약간 높은 발현 양을 보였다. *Barx1*의 발현양은 세 부위에서 뚜렷한 차이를 보이며 앞니에서 어금니로 갈수록 그 발현 양이 많은 것을 확인하였다. *Msx1*과 *Msx2*의 경우 앞니에서 가장 높은 양이, 치간극에서 가장 적은 양으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

*Shh*은 앞니와 어금니에서 치간극에 비해 그 발현 양이 높은 것을 확인하였다. *Ptc*는 앞니에서 가장 높게 어금니에서 가장 낮게 발현되었으며 *Gli3*의 경우 앞니에서 가장 강하게 치간극에

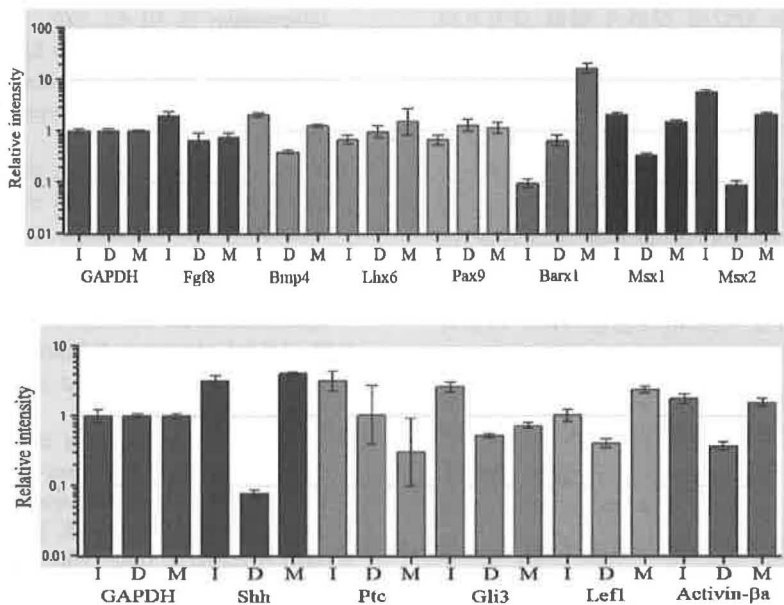


Figure 4. Relative gene expression levels of comparing GAPDH with *Fgf8*, *Bmp4*, *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*, *Msx1*, *Msx2*, *Shh*, *Ptc*, *Gli3*, *Lef1*, *Activin-βa* at E16.5 (I: incisor, D: diastema, M: molar).

서 가장 약하게 발현되었다. *Lef1*의 발현 양은 어금니에서 높게 나타났으며 앞니, 치간극의 순으로 발현 양이 낮게 나타났다. *Activin-βa*는 앞니와 어금니에서 비슷한 수준으로 강하게, 치간극에서 약하게 발현되는 것을 확인하였다.

VII. 결 론

치아발생에 관여하는 유전자는 약 300개 정도인 것으로 보고되어 있다.⁵⁾ 생쥐의 치아발생 단계인 판시기 (E10.5), 싹시기 (E13.5), 모자시기 (E14.5), 그리고 종시기 (E16.5)에서 상피세포와 간엽세포간 신호전달은 치아발생을 유도하는 핵심적인 역할을 하며, 그들 사이에서 특정 유전자의 발생단계별 발현율의 변화는 치아의 발육과 형태, 그리고 크기 등을 결정하는 요소인 것으로 알려져 있다.¹⁻⁹⁾ 이번 연구에서는 E10.5부터 E16.5시기의 생쥐 배아로부터 앞니와 어금니 그리고 치간극을 아래턱 발생부위로부터 분리하여 치아발생에 있어 주요하게 관여하는 것으로 알려진 12개의 유전자 *Fgf8*, *Bmp4*, *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*, *Msx1*, *Msx2*, *Shh*, *Ptc*, *Gli3*, *Lef1*,

*Activin-βa*의 발현 양을 조사하였다.

이미 알려진 대로 *Fgf8*, *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*은 E10.5에서 E14.5시기까지 어금니부분에서 앞니와 치간극부분에 비하여 많은 양이 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 종시기에 이르러 *Fgf8*의 발현양은 오히려 앞니 쪽에서 높게 나타났으며 *Lhx6*, *Pax9*은 세 부분에서 비슷한 양이 발현되는 것으로 확인되었다. 이러한 시기에 따른 유전자 발현양의 변화 추이는 치아발생 과정 중 각 시기별로 필요로 하는 유전자가 각기 다르다는 것을 의미한다. *Barx1*의 경우 특이하게 모든 시기에서 어금니부위에 앞니에 비해 매우 강하게 발현되는 것을 알 수 있다. 반면 *Bmp4*, *Msx2*의 경우 앞니의 발생에 밀접하게 관여하는 것으로 보이며 *Msx1*은 치아판 시기에서는 앞니에서 강하게 그 후로는 앞니와 어금니에서 비슷한 양으로 발현되었다. 이러한 연구결과는 이전연구에서 밝혀진 치아발생 초기시기에 *Fgf8*이 *Lhx6*와 *Pax9*의 발현을 유도한다는 사실과 *Bmp4*가 *Msx1*의 발현을 유도하고 *Barx1*의 발현을 억제한다는 사실^{10,19-22)}을 수치적으로 확인했다는데 의미가 있다고 할 수 있을 것이다.

*Shh*은 초기에는 앞니에 강하게 발현 되었으며 싹시기를 지나면서 그 차이가 점차 줄어 종시기에서는 앞니와 어금니에서 비슷한 양으로 발현 되는 것을 알 수 있었다. *Shh*의 receptor인 *Ptc*는 *Shh*보다 빠르게 그 발현 양이 변화하였다. *Ptc*는 판시기에서 앞니에 많은 양이 발현되었으며 싹시기에서 앞니와 어금니에 비슷한 수준으로 발현 되었고 모자시기에서 어금니에 더 강하게 발현되었다. 종시기에 이르러 *Ptc*는 다시 어금니에 비해 앞니에 강하게 발현되는 것을 확인하였다. *Shh* signaling 역시 치아발생 중 시기에 따라 그 발현 양이 변화하는데 이는 *Shh* receptor인 *Ptc*의 변화에 기인한다고 볼 수도 있을 것이다. *Gli3*, *lef1*, *Activin-ba*의 경우 판시기에서 모자시기까지 그 발현 양이 세 부위에서 큰 차이를 보이지 않았으나 종시기에 이르러 *Gli3*는 앞니에서 강하게 *Lef1*은 어금니에서 강하게 그리고 *Activin-ba*는 앞니와 어금니에서 비슷하게 발현되는 양상을 보였다. 이전연구에서 *Gli3*는 *Shh*에 의해 조절된다고 알려져 있으나²³⁾ 본 연구의 결과에 따르면 그 발현 양의 패턴이 서로 같지 않은 것을 확인 할 수 있었다. *Lef1*은 세포주기와 세포의 생존에 깊은 연관이 있는 Wnt signaling과 깊은 관계가 있는 것으로 보고되어 있다.²⁴⁾ 이러한 *Lef1*의 역할 때문에 각 시기의 세 부위 모두에서 비슷한 수준의 발현 양을 보이는 것으로 생각 된다. 이전 연구에서 *Activin-ba*의 발현은 Fgf signaling에 의해 유도된다는 사실이 알려져 있다.²⁵⁾ 본 연구결과에서 싹시기 이후 *Activin-ba*의 발현양상이 *Fgf8*과 유사하다는 사실을 확인하였다.

이렇게 유전자의 발현 율을 발생단계별로 정량적으로 측정하여 시간에 따른 발현 변화를 상대적으로 비교하며 살펴보는 것은 치아 발생 동안 유전자의 상호관계를 이해하는데 있어 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Cho SW, Lee HA, Cai J, Lee MJ, Kim JY, Ohshima H, Jung HS : The primary enamel knot determines the position of the first buccal cusp in developing mice molars.

- Differentiation 75: 441-451, 2007.
2. Kim JY, Cha YG, Cho SW, Kim EJ, Lee MJ, Lee JM, Cai J, Ohshima H, Jung HS : Inhibition of apoptosis in early tooth development alters tooth shape and size. J Dent Res 85: 530-535, 2006.
3. Jernvall J, Jung HS : Genotype, phenotype, and developmental biology of molar tooth characters. Am J Phys Anthropol 31: 171-190, 2000.
4. Thesleff I, Kernen S, Jernvall J : Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. Adv Dent Res 15: 14-18, 2001.
5. Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Berg T : Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. Conn Tiss Res 32: 915, 1995.
6. Thesleff I : The genetic basis of tooth development and dental defects. Am J Med Genet A 140: 2530-2535, 2006.
7. Pispas J, Thesleff I : Mechanisms of ectodermal organogenesis. Dev Biol 262: 195-205, 2003.
8. Peters H, Balling R. Teeth : Where and how to make them. Trends Genet 15: 59-65, 1999.
9. Jowett AK, Vainio S, Ferguson MW, Sharpe PT, Thesleff I : Epithelial-mesenchymal interactions are required for *msx1* and *msx2* gene expression in the developing murine molar tooth. Development 117: 461-470, 1993.
10. Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT : Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. Science 282: 1136-1138, 1998.
11. Aberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo HM, Thesleff I : Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. Dev Biol 270:76-93, 2004.
12. Tucker AS, Al Khamis A, Sharpe PT : Interactions between Bmp-4 and Msx-1 act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. Dev Dyn 212: 533-539, 1998.
13. Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V : Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. Development 125: 2063-2074, 1998.
14. Ogawa T, Kapadia H, Wang B, D'Souza RN : Studies on Pax9-Msx1 protein interactions. Arch Oral Biol 50: 141-145, 2005.
15. Ogawa T, Kapadia H, Feng JQ, Raghov R, Peters H, D'Souza RN : Functional consequences of interactions between Pax9 and Msx1 genes in normal and abnormal tooth development. J Biol Chem 281: 18363-18369, 2006.
16. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K : Expression of Sonic hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. J Oral Pathol Med 33: 185-90, 2004.
17. Williams AE, Moschos SA, Perry MM, Barnes PJ, Lindsay MA : Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development.

- Dev Dyn 236: 572-580, 2007.
18. Cain JE, Bertram JF : Ureteric branching morphogenesis in BMP4 heterozygous mutant mice. *J Anat* 209: 745-755, 2006.
19. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I : Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75: 45-58, 1993.
20. Neubser A, Peters H, Balling R, Martin GR : Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 90: 247-255, 1997.
21. Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V : Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 125: 2063-2074, 1998.
22. Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT : Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 282: 1136-1138, 1998.
23. Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT : The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 125: 2803-2811, 1998.
24. Sasaki T, Ito Y, Xu X, Han J, Bringas P Jr, Maeda T, Slavkin HC, Grosschedl R, Chai Y : LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 278: 130-143, 2005.
25. Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV, Maas RL, Chuong CM, Schimmang T, Thesleff I : An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol* 5: e159, 2007.

- ABSTRACT -

Comparison of Time Course Gene Expression Levels in Developing Tooth Germ

Jong-Min Lee, Hee-Sun Chung, Sung-Won Cho, Han-Sung Jung

*Department of Oral Biology, Oral Science Research Center, College of Dentistry,
Brain Korea 21 Project, Yonsei University, Korea*

The meaningful genes related to tooth development are known as 300. The observation of time0course patterns of them is possible to predict the gene interactions. In this study, we focused on 12 meaningful genes in developing tooth germ such as *Fgf8*, *Bmp4*, *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*, *Msx1*, *Msx2*, *Shh*, *Ptc*, *Gli3*, *Lef1*, *Activin-ba*. Theses genes are related to the epithelial-mesenchymal interaction. We performed real-time quantitative PCR for confirm the gene expression level of each gene from embryonic day 10.5 to 16.5. The application of the expression level and approaching method has demonstrated the useful of the guidelines for research of gene interaction during tooth development.

Key wirds: Real-time quantitative PCR, Tooth development, *Fgf8*, *Bmp4*, *Lhx6*, *Pax9*, *Barx1*, *Msx1*, *Msx2*, *Shh*, *Ptc*, *Gli3*, *Lef1*, *Activin-ba*.