

# 齒周靱帶細胞의 生化學的 特異性에 對한 研究

檀國大學校 齒科大學 矯正學教室

趙誠旭 · 車敬石

## 목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도

## I. 서 론

치아의 교정력을 가하게 되면 압박을 받는 부위에서는 파골세포가 나타나서 치조골을 흡수하게 되고, 장력을 받는 부위에서는 조골세포가 나타나서 신생골을 형성하게 되는데 이러한 골개조 현상을 통하여 치아 이동이 일어나게 된다<sup>1,2,3,4,5,6</sup>. 이와같은 골개조 현상은 전적으로 기존의 치조골 자체에만 국한하여 일어나기 보다는 치주인대세포가 이러한 현상에 대한 역할을 할 것이라는 연구가 계속되어 왔다.

치주인대의 형성과정을 보면 백악질로부터 나온 짧고 치밀하게 배열된 백악질섬유와 치조골로부터 나온 분리된 치조섬유가 치아의 장축에 평행하게 배열되어 이루어 지는 것으로 알려져 있다<sup>7</sup>.

이와같이 형성된 치주인대는 비석회화된 결

체조직으로서 다른 결체조직과 성격을 달리하며 힘을 흡수, 전달하는 기능을 하는 것이외에도 치주인대내에 있는 혈관, 임파관에 의하여 백악질, 골, 치은에 영양을 공급하기도 하며, 고유감각 및 촉각을 제공하는 것으로 알려져 있다<sup>8,9,10,11,12,13,14,15</sup>.

freeman등<sup>9,16,17</sup>은 치주인대의 미분화된 간엽세포들은 혈관 근처에 있다가 후에 치조골, 치아쪽으로 이주하면서 섬유아세포, 백악아세포, 조골세포로 분화되기 위한 progenitor cell 이라고 생각하였다. 1972년 Arnold와 Baram<sup>18</sup>은 Rhesus monkey의 치주인대세포 배양을 처음으로 시작함으로써 이전까지는 치주인대의 형태학적인 면에서 연구되어왔던 것이 이제는 생화학적인 면에서 치주인대세포의 역할에 대한 연구가 활발하게 되었다. Limeback<sup>19,20</sup>에 의하면 치주인대세포는 Type, I, III, V collagen을 형성한다고 하였으며, Gottlow등<sup>21,22</sup>은 치주인대세포가 치주재생에 중요한 역할을 할뿐 아니라 백악질 석회화에 관여 한다고 주장하였다. Aukhil<sup>23</sup>은 Beagle dog의 치주인대를 제거한 후 치주창상에 대한 연구에서 치주인대세포가 백악질을 형성하는 능력이 있다고 하였다.

Brunette등<sup>24,25</sup>은 porcine 및 monkey의 치주인대조직으로부터 <sup>3</sup>H-Thymidine을 사용한 자기방사선적연구에서 형태적으로 뚜렷이 다른 섬유아세포와 상피세포를 발견하였고 상피세포

는 *Malassez*상피잔사에서 유래된다고 하였다. 이러한 치주인대세포에서의 섬유아세포와 상피세포에 대한 연구는 *Tyrpsinization*<sup>26)</sup> 및 *Keratinization*<sup>27)</sup>에 의하여 연구되어져 왔다.

*Robert*와 *Chase*<sup>28)</sup>에 의하면 교정적으로 유도된 골형성동안에 *Sprague-Dawley rats*구치치주인대의 세포역동학에 대한 연구에서 치주인대로부터 증식하는 세포들은 골면쪽으로 이주하며 이 세포는 DNA합성없이 조골세포를 형성할 수 있는 전조골세포(*preosteoblast*)로서 존재하며, 조골세포는 치주인대로부터 유래된다고 하였다.

*Limeback*<sup>20)</sup>등은 교정적 치아 이동시 치주인대세포는 인접한 백악질과 치조골의 개조에 중요한 역할을 한다고 주장하였다.

이와같은 치주인대세포가 조골세포와 같은 성질을 가지는데 대한 연구가 계속적으로 많은 선학들에 의하여 시행되어져 왔다. 즉, 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 조골세포의 *marker enzyme*인 *alkaline phosphatase*활성도가 더 높게 나타나며<sup>29,30,31,32,33,34)</sup>, *Type I, III, V collagen*을 합성<sup>29,20,35,36)</sup>하고, *bone associated extracellular matrix* 구성성분인 *osteonectin*<sup>36,37,38)</sup>, *Bone proteoglycan I*<sup>36)</sup>, *Bone sialoprotein I*<sup>39,40)</sup>등을 생성함으로써 치주인대세포는 다른 결체조직에 존재하는 세포와 다르며 경조직을 형성하는 세포의 특성과 유사하다는 연구가 계속되고 있다. 이에 저자는 *alkaline phosphatase*활성도 및 칼슘의 세포내로의 유입과 세포로부터의 유리에 관한 실험을 통하여 치주인대세포가 치은섬유아세포에 비해 조골세포에 대한 유사성에 있어 어떠한 차이점이 있는지 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 세포분리 및 배양

본 실험에 사용된 세포는 단국 대학교 치과대학 부속 치과병원 교정과에 내원하여 상, 하악 제 1,2소구치 발거를 요하는 환자로서 전신

질환이 없고, 건강이 양호하며, 임상적으로 치주질환이 없다고 판정된 환자의 치은조직 및 치아를 발거, 채득하여 초기배양 후 계대배양을 통하여 얻은 치은섬유아세포 및 치주인대세포를 사용하였다.

치아를 발거하기 1주일 전부터 환자에게 잇솔질을 잘 하도록하고, 클로르헥사메드(부광약품)로 양치하도록 권유한 후 무균상태에서 발거할 치아 주변의 치은을 채취하여 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)가 포함된 minimum essential medium(MEM, Gibco)으로 세척하고 scalpel를 이용하여 mincing한 후 10% FBS가 포함된 MEM이 들어있는 60mm culture dish(Corning)에 위치시킨 후 37°C에서 95% 습도를 유지하면서 5% CO<sub>2</sub>가 함유된 CO<sub>2</sub> incubator(Precision scientific)에서 배양하였다.

치주인대세포의 분리를 위하여 발거된 치아를 10% FBS가 첨가된 MEM으로 3-4회 세척을 한 후 치주인대를 *currette*를 이용하여 채득한 후 치은섬유아세포와 동일한 조건으로 배양하였다. 10% FBS가 첨가된 MEM을 매일 교환하며 위상차현미경을 사용하여 배양조직으로부터 치은섬유아세포 및 치주인대세포가 조직외부로 자라나오는 것을 관찰한 후 0.5% Trypsin 과 5.3mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA, Gibco)로 세포를 떼어내어 1000×g로 4°C에서 10분간 원심분리하여 세포를 수집한 후 Hanks' balanced salt solution(HBSS, Gibco)을 사용하여 2-3회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 MEM에서 35mm배양접시에 1:5로 계대배양을 시행하였으며 이중일부는 이후 실험을 위하여 세포를 수거하여 10% dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)가 포함된 배양액에 넣은후 서서히 냉동시켜 액체질소통(MVE)에 저장하였다.

### 2. Alkaline phosphatase(ALP)활성도 측정

배양중인 세포를 trypsin-EDTA로 처리하여 세포들을 수거한 후 증류수를 넣고 ultrasonic disruptor(UR-20P, Tomy)를 사용하여 세포

막을 파괴하여 ALP의 활성도를 측정에 사용하였다.

ALP활성도의 측정을 위해 p-nitrophenyl phosphate(PNPP, Sigma)를 기질로 하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 기질로부터 유리되어 나오는 p-nitrophenol(PNP)을 spectrophotometer(UV-120, Shimadzu)를 이용하여 비색정량하였다. 이때 pH 10.3인 0.1M glycine-NaOH완충액에서 효소반응을 시켰으며 세포파괴액의 단백질 농도는 Lowry등의 방법<sup>42)</sup>을 이용하여 정량하였다. ALP의 효소 활성도는 세포파괴액의 단백질 mg당 기질로부터 유리되어 나온 PNP의 농도로 계산하여 치은섬유아세포와 치주인대세포의 활성도를 비교하였다.

### 3. Calcium의 uptake와 release분석

세포막내로 칼슘의 유입 및 세포막외로의 유입된 칼슘의 세포막외로 유리를 알아보기 위하여 반감기가 163일이며, 최대  $\beta$  에너지가 0.257MeV인  $^{45}\text{CaCl}_2$  (NEZ-013, 0.7329GBq/mg)를 사용하였다.

$^{45}\text{Ca}$  Uptake를 관찰하기 위하여 배양중인 치은섬유아세포와 치주인대세포의 배양액에 20  $\mu\text{Ci}$ 의  $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 넣고 30분, 1시간, 2시간 및 4시간이 경과된 후 각각의 배양접시내 배양액을 제거하고 trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 수거하였다. 증류수 0.5ml를 넣고 ultrasonic disrupter를 이용하여 세포막을 파괴한 후 세포파괴액의 일정량을 취하여 cocktail solution에 넣은 후 Liquid scintillation counter(Beckman, LS 5000TA)를 이용하여 세포막내로 유입된  $^{45}\text{Ca}$ 양을 측정하였다.

$^{45}\text{Ca}$ 의 유리양을 관찰하기 위하여 20  $\mu\text{Ci}$ 의  $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 넣고 2시간동안 배양한 후 배양액을 제거하고 배양중인 세포는 HBSS를 이용하여 2-3회 세척하였다. 그 후 신선한 배양액을 넣고 30분, 1시간, 2시간 및 4시간후 치은섬유아세포와 치주인대세포로부터 각각의 배양액내로 유리되어 나온  $^{45}\text{Ca}$ 의 양을 측정하기 위하여 배양액의 일정량을 cocktail solution에

넣은후 Liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

## III. 실험성적

### 1. 세포분리 및 배양

치은섬유아세포는 explant culture후 3일이 지나면 상피세포의 왕성한 성장을 보이다가 (Fig. 4) 5일후 방추형의 섬유세포의 출현을 시작으로 상피세포의 성장은 보이지 않았고 섬유아세포의 성장만을 보였다. 치주인대세포는 explant culture후 6일 경과후부터 방추형의 세포들이 출현하였다(Fig. 5). 치은섬유아세포의 성장이 이루어지면 치주인대세포와는 형태적으로 식별할 수 없었다(Fig.6 및 7).

### 2. Alkaline phosphatase활성도 측정

세대를 증가시키면서 alkaline phosphatase의 활성도 변화를 측정된 결과 치주인대세포는 2세대에서 가장높은 alkaline phosphatase활성도를 보였으며, 세대가 증가하면서 감소하는 경향을 보였다. 반면에 치은섬유아세포는 세대가 증가하면서 alkaline phosphatase활성도가 별다른 차이를 나타내지 않았다. 이와함께 치주인대세포의 alkaline phosphatase활성도는 전세대를 통하여 치은섬유아세포에 비해 유의성있게 높은 활성도를 나타내었다(Table 1 및 Fig. 1).

Table 1. Activities of alkaline phosphatase in human periodontal ligament cells (PDL) and gingival fibroblasts (GFB)

Enzyme activity (nmole substrate cleaved/mg protein)		
Passage	P D L	G F B
First	69.16 $\pm$ 5.98*	8.58 $\pm$ 1.09
Second	89.34 $\pm$ 3.16*	10.48 $\pm$ 0.49
Third	48.94 $\pm$ 7.31*	9.51 $\pm$ 0.92
Fourth	37.60 $\pm$ 1.31*	8.21 $\pm$ 0.75
Fifth	31.84 $\pm$ 1.00*	8.17 $\pm$ 0.71

Values are Mean  $\pm$  S.E. (n = 4)

\*p < 0.01, compared to gingival fibroblasts.

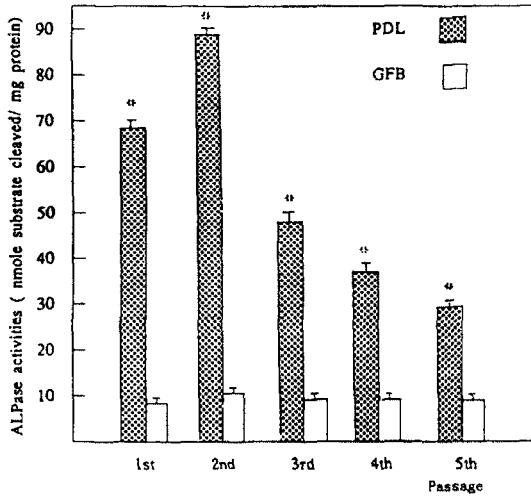


Fig. 1. Alkaline phosphatase activities of human periodontal ligament cells (PDL) and gingival fibroblasts (GFB). Each bar represents the mean and standard error for four wells. \* $p < 0.01$ , compared to gingival fibroblasts.

### 3. Calcium Uptake와 Release 분석

시간이 경과함에 따라  $^{45}\text{CaCl}_2$ 가 세포막내로 유입되는 양은 치주인대세포 및 치은섬유아세포 모두 2시간대에서 가장 높은 칼슘의 유입량을 보였으며, 전반적으로 치주인대세포가 치은섬유아세포에 비하여 높은 칼슘의 유입량을 보이고 있었다(Fig. 2).

2시간동안  $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 배양중인 치주인대세포 및 치은섬유아세포의 배양액에 넣고 preincubation하여  $^{45}\text{Ca}$ 를 유입시킨 후 각 시간대에 따라 배양액으로 유리되어 나오는 칼슘의 양을 측정하여 본 결과 치주인대세포가 초기에 많은 양의 칼슘의 유리를 보였던 반면에 치은섬유아세포는 완만한 유리를 보였다(Fig. 3).

### IV. 총괄 및 고안

Piche등<sup>49)</sup>에 의하면 치주인대세포와 치은섬유아세포는 배양접시내에 세포들이 밀생되기

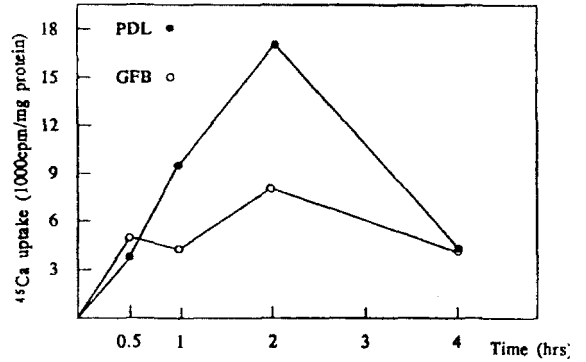


Fig. 2. Time course of  $^{45}\text{Ca}$  uptake from the  $^{45}\text{CaCl}_2$  contained MEM into human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts.

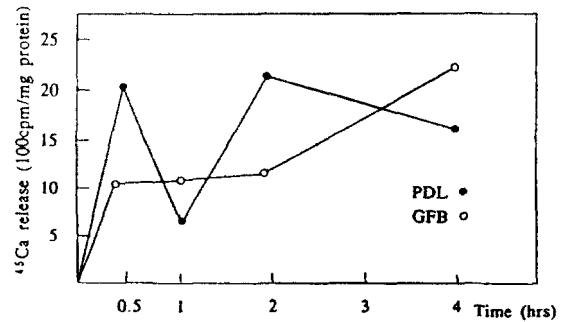


Fig. 3. Time course of  $^{45}\text{Ca}$  release from the human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts which were preincubated in  $^{45}\text{CaCl}_2$  contained MEM for 2 hours.

이전에는 차이점이 없으나 배양접시내에 세포들이 밀생에 이르게되면 치주인대세포는 치조골세포와 같이 다층으로 정열을 이루지 않은 형태를 이루기도 치은섬유아세포와 같이 단층으로 방추형 형태를 보이기도 한다고 보고한 바 있다. 또한 Brunette등<sup>62)</sup>은 돼지의 치주인대세포로부터 상피세포와 섬유아세포를 모두 분리한 바 있다. 본 실험에서 나타난 치은섬유아세포는 치은조직에서 채취한 후 2-3일간 배양한 후에 나타난 상피세포의 출현으로 치주인대세포와는 구별이 가능하나 5일후에 방추형의 세포들이 출현하게 되면 치주인대세포와 식별이 어려웠는데 이는 치주인대세포와 치은섬유

아세포는 방추형 형태의 길쭉한 섬유아세포와 같이 유사한 형태를 보인다고 보고한 Someer-man<sup>33)</sup>, Ragnarsson<sup>27)</sup>의 실험결과와 일치하였다.

1917년 Levene과 Medigreceanu<sup>42)</sup>는 신장과 장점막에서 처음 알칼리성 인산가수분해효소를 밝혀냈으며, 1923년 Robison에 의해 이의 역할에 대하여 연구된 바 이는 유기 인산염으로 부터 무기 인산염을 분리시키는 효소가 골내에 존재한다고 믿고 알칼리성 인산가수분해효소가 골 석회화 기전에 관여하는 것으로 추정하였다. 즉, 인산가수분해효소는 조직액에 존재하는 유기 인산염을 분해하며 무기 인산염 농도를 높이며 충분한 양의 무기 인산염 이온이 축적되면 칼슘 이온과 결합하여 골을 형성한다고 하였다<sup>43)</sup>.

1961년 Fleish와 Neuman은 알칼리성 인산가수분해효소는 콜라겐 석회화의 억제인자 무기 피로인산염을 파괴함으로써 골 형성 부위에 작용한다고 하였다<sup>44)</sup>. 이와같이 알칼리성 인산가수분해효소는 골 석회화에 있어서 여러 다른 효소와 함께 임상적으로 중요한 효소 중의 하나로 인식되고 있다<sup>45)</sup>.

본 실험에서 치주인대세포와 치은섬유아세포를 2세대부터 5세대까지 배양후 치주인대세포와 치은섬유아세포간의 알칼리성 인산가수분해효소 활성도를 측정된 결과 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 유의성있게 높은 알칼리성 인산가수분해효소 활성도를 보였는데 이는 Somerman<sup>33)</sup>, Maeder<sup>46)</sup>, Kawase<sup>48)</sup>, Piche<sup>49)</sup>의 실험 결과와 일치하였으나 나타난 양상은 다소 차이점을 보였다. Somerman<sup>33)</sup>은 동일환자, 동일세대의 치주인대세포와 치은섬유아세포의 알칼리성 인산가수분해효소 활성도를 비교한 실험에서 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 높은 활성도를 보였으며, 치주인대세포 및 치은섬유아세포의 활성도는 실험개체에 따라 다양성을 보이고 있다고 보고하였다.

Maeders<sup>46)</sup>은 치주조직세포에서 알칼리성 인산가수분해효소 및 osteocalcin level에 대한 실험에서 치주인대세포는 치조골세포에 비하여 상

당히 낮은 수치를 보인 반면에 치은섬유아세포와는 개체에 따라 유사하거나 크다고 하였으며, Piche<sup>49)</sup>은 이와 동일한 결과를 나타내었다 하였다. 본 실험에서 각세대간의 치주인대세포는 치은섬유아세포에 비하여 알칼리성 인산가수분해효소 활성도가 높게 나타났으며, 2번째 세대의 치주인대세포에서 활성도가 가장 높으며, 세대가 증가하면서 낮은 활성도를 보이고 치은섬유아세포는 세대가 증가하면서 큰 차이점이 없이 낮게 나타났다. Kawase<sup>48)</sup>은 치조골세포와 치은섬유아세포와의 비교에서 치주인대세포가 치조골세포와 유사한 수치를 보인 반면에 치은섬유아세포는 매우 낮은 수치를 보인다 하였다. 반면에 Ohshima<sup>47)</sup>의 치주인대세포와 치은섬유아세포간의 알칼리성 인산가수분해효소 활성도에 대한 실험에서, 7명의 개체에서 치은섬유아세포는 개체간의 차이는 크지 않았으며 알칼리성 인산가수분해효소 활성도는 낮았고, 치주인대세포인 경우는 개체간의 차이는 컸으며 알칼리성 인산가수분해효소 활성도는 높게 나타난다고 하였다. Somerman<sup>33)</sup>은 한 개체내에서 치주인대세포의 알칼리성 인산가수분해효소 활성도가 치은섬유아세포보다는 크다고 하였지만 Ohshima<sup>47)</sup>등은 다른 개체를 통한 실험에서 절대적으로 치주인대세포가 치은섬유아세포에 비하여 높음을 통해 치주인대세포는 치은섬유아세포와 달리 석회화작용을 할 수 있는 기능을 가졌을 것이라 제안하였다.

Yamada<sup>50)</sup>은 기능을 하는 치아의 치주인대세포가 기능을 하지 않는 치아의 치주인대세포보다 알칼리성 인산가수분해효소와 Ca-ATPase수치가 높았으며, 이들 효소의 활성도는 치조골이나 백악질 근처에 있는 치주인대세포에서 높게 나타남을 통해 치주인대세포가 다른 결체조직과는 다르며 조골세포와 유사하다고 하였다.

칼슘대사는 수많은 화합물에 의하여 조절되며 이들중 주요한 것은 부갑상호르몬(PTH)와 칼시토닌(CT) 및 Vitamin D<sub>3</sub>인 것으로 알려져 있다. PTH는 칼슘의 혈중농도에 의해 조절되는데<sup>51,52)</sup> 칼슘농도가 감소하면 분비가 증가하게 된다. PTH의 골조직에 대한 기능은 골조직을 흡수하여 혈장 칼슘농도를 증가시킬

뿐만 아니라 조골세포의 증식을 자극한다고 알려져 있다<sup>53,54</sup>). 각종 석회화된 조직의 세포 및 세포성분들의 골의 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다. 이러한 세포들의 구조적<sup>55</sup>) 또는 생화학적<sup>56</sup>) 연구가 되어 왔지만 석회화 초기과정에 대한 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 석회화의 기전을 이해하는데는 칼슘의 대사 및 mitochondria에 대한 이해가 중요한 것으로 생각되고 있다<sup>57,58</sup>).

Reith와 Boyde<sup>59</sup>)에 의하면 odontoblast가 활발하게 활동하여 상아질을 형성할때 칼슘 uptake가 증가한다고 하였으며 Sayegh등<sup>60</sup>)에 의하면 백서에  $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 주사한후 치배에 의한 labeled칼슘의 최대 uptake는 주사후 15분이었으며 30분이 지나면 상당한 감소를 보인다고 하였고, 석회화를 하고있는 조직에서 높게 나타난다고 하였다. 또한 Shaw등<sup>61</sup>)에 의하면 토끼 장골의 골아양세포의 기능평가에 대한 실험에서 성장하는 골에서 칼슘 uptake가 높다고 하였다.

본 실험은  $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 이용한 연구에서 시간이 경과함에 따라 세포막내로 유입된  $^{45}\text{Ca}$ 의 유입되는 양은 Fig. 2와 같으며 치주인대세포인 경우 2시간대에서 가장 높은  $^{45}\text{Ca}$ 유입을 나타내었다. 또한 전시간대에 걸쳐서 세포막내로의  $^{45}\text{Ca}$ 유입은 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 높은 수치를 보이고 있었다.

세포막내로 유입된  $^{45}\text{Ca}$ 이 시간이 경과함에 따라 세포막에서 유리되어 나오는 양은 Fig. 3과 같으며 치주인대세포인 경우 비교적 초기에 높은 유리를 볼 수 있었으며, 치은섬유아세포는 시간이 경과함에 따라 칼슘의 유리가 증가하는 경향을 보였다.

이를 통하여 치주인대세포와 치은섬유아세포는 서로 다른 성질을 보였으며, 치주인대세포가 조골세포와 유사한 성질을 보이는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 실험은 치주인대세포와 치은섬유아세포간에 어떠한 차이점이 있는가를 알아보기 위하여

조골세포의 marker enzyme인 alkaline phosphatase의 활성도를 세대를 증가시키면서 측정하여 비교하였고, 골형성에 관여하는 칼슘이 세포막내외로 유입 및 유리되는 정도를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치주인대세포는 치은섬유아세포에 비하여 alkaline phosphatase 활성도가 높게 나타났으며, 2번째 세대의 치주인대세포에서 활성도가 가장 높았으며, 세대가 증가하면서 활성도가 감소한 반면 치은섬유아세포는 세대가 증가하면서 큰 차이점이 없이 낮게 나타났다.
2. 치주인대세포와 치은섬유아세포 각각의  $^{45}\text{Ca}$ 유입은 2시간대에서 가장 높게 나타났으며 전 시간대에 걸쳐서 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 칼슘유입이 큰것으로 나타났다.
3. 치은섬유아세포의  $^{45}\text{Ca}$ 유리는 시간이 경과하면서 완만한 증가를 보이는 반면에 치주인대세포는 초기에 급격한 증가를 보였다.

## REFERENCES

1. Aisenberg, M.S.: The tissue and change involved in orthodontic tooth movement, Am. J. Orthod. 34:354-357, 1948.
2. Reitan, K.: The tissue behavior during orthodontic movement, Am. J. Orthod. 46: 881-900, 1960.
3. Reitan, K.: Biomechanical principle and reactions. In current orthodontic principles and techniques. ed by Graber, T.M., W.B. Saunders, Philadelphia, 56-159, 1969.
4. Reitan, K. and Kvam, E.: Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement, Angle Orthod. 41:1-14, 1971.
5. Reitan, K.: Initial behavior during apical root resorption, Angle Orthod. 44:68-82, 1974.

6. Kvam, E.: Scanning electron microscopy of tissue changes in the pressure surface of premolar following tooth movement, *Scand. J. Dent. Res.* 80:357-368, 1972.
7. Grant, D.A., and Bernick, S.: The formation of the periodontal ligament, *J. Periodontol.* 43:17, 1972.
8. Thomas, N.G.: Elastic fibers in periodontal membrane and pulp. *J. Dent. Res.*, 7:325, 1927.
9. Church, H., and Dolby, A.E.: The effect of age on the cellular immune response to dento-gingival plaque extract. *J. Periodont. Res.* 13:120, 1978.
10. Box, K.F.: Evidence of lymphatics in the periodontium. *J. Can. Dent. Assoc.*, 15:8, 1949.
11. Bernick, S.: Innervation of the teeth and periodontium. *Dent. Clin. North Am.*, 503, 1969.
12. Tryde, G., Frydenberg, O., and Brill, N.: An assessment of the tactile sensibility in human teeth. An evaluation of a quantitative method. *Acta Odontol. Scand.*, 20: 233, 1962. 11.
13. Bien, S.M.: Hydrodynamic damping of tooth movement. *J. Dent. Res.*, 45:907, 1966.
14. Folke, L.E.A., and Stallard, R.E.: Periodontal microcirculation as revealed by plastic microspheres. *J. Periodont. Res.*, 2:53, 1967.
15. Kizior, J.E., Cuozzo, J.W., and Bowman, D.C.: Functional and histologic assessment of the sensory innervation of the periodontal ligament of the cat. *J. Dent. Res.*, 47:59, 1968. 14.
16. Freeman, E., and Ten Cate, A.R.: Development of the periodontium: an electron microscopic study, *J. Periodontol.* 42: 387, 1971.
17. Ten Cate, A.R.: Cell division and periodontal ligament formation in the mouse, *Arch. Oral Biol.* 17:1781, 1972.
18. Arnold L.F. and Baram P.: In vitro culture of periodontal ligament cells. *J. Dent. Res.* 51:953-959, 1972.
19. Limeback, H., Sodek, J.: Procollagen synthesis and processing in periodontal ligament in vivo & in vitro: comparative study using slab-gel fluorography. *Eur. J. Biochem.* 100, 541-550, 1979.
20. Limeback, H., Sodek, J., and Aubin, J.E.: Variation in collagen expression by cloned periodontal ligament cells. *J. Periodont. Res.* 18:242-248, 1982.
21. Gottlow, J., Nyman, S., and Karring, T.: New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodont.*, 11, 494-503, 1984.
22. Gottlow, J., Nyman, S., and Lindhe, A.: New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. *J. Clin. Periodont.*, 13:604-616, 1986.
23. Aukhil, I., Pettersson, E. and Suggs, C.: Periodontal wound healing in the absence of periodontal ligament cells. *J. Periodontol.* 71-77, 1987.
24. Brunette, D.M., Melcher, A.H. and Moe, H.K.: Culture and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspensions, *Arch. Oral Biol.*, 21:393-400, 1976.
25. Brunette, D.M., Kanoza, R., Marmary, Chan, Y.J., and Melcher, A.H.: Interactions between epithelial and fibroblast-like cells in cultures derived from monkey periodontal ligament. *J. Cell Sci.* 27:127-140, 1977.
26. Blomlof, L., Otteskog, P.: Composition of human periodontal ligament cells in tissue

- culture. *Scand. J. Dent. Res.*, 89:43-47, 1981.
27. Ragnarsson, B., Carr, G., and Daniel, J.C.: Isolation and growth of human periodontal ligament cells in vitro. *J. Dent. Res.* 64(8): 1026-1030, 1985.
  28. Eugene, R.W., Donald, C.: Kinetics of cell proliferation and migration associated with orthodontically induced osteogenesis. *J. Dent. Res.* 60(2): 174-181, 1981.
  29. Leonard, E.P.: Enzyme histochemistry of periodontal pathogenesis in the rice rat. *Cell Mol. Biol.* 24:241-248, 1979.
  30. Lilja, E., Lindskog, S., and Hammarstrom, L.: Alkaline phosphatase activity and tetracycline incorporation during initial orthodontic tooth movement in rat. *Acta Orthodol. Scand.* 42:1-11, 1984.
  31. Kawase, T., Sato, S., Yamada, M., Hirayama, A., Miake, K., and Saito, S.: Human periodontal ligament cells in vitro: Characterization of alkaline phosphatase, *J. Bone Mineral Res.* 1 (Supple 1): 63A, 1986.
  32. Piche, J.E., Carnes, D.L., Graves, D.T.: Characterization of a Non-fibroblast cell population derived from human periodontal ligament, *J. Dent. Res.* 66:356, Abst. No. 1998, 1987.
  33. Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R. and Foster, R.A.: A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, *J. Dent. Res.* 67: 66-70, 1980.
  34. Mitsuhiro, O., Fumiyuki, K., Kichibee, O., Ryozo, S., Shogo, S., and Kantaro, S.: Alkaline phosphatase activities of cultured human periodontal ligament cells, *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 30:208-217, 1988.
  35. Hurum, S., Sodek, J. and Aubin, J.E.: Synthesis of collagen, collagenase and cell aganase inhibitors by cloned human gingival fibroblasts and the effect of concanavalin A. *Bioche. and Biophys. Res. Commun.* 107:357-366, 1982.
  36. Wasi S., Otsuka, Yao K.L., Tung P.S., Aubin J.E., Sodek J., and Termine J.D.: An osteonectine-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62:470-478, 1984.
  37. Fisher L.W., and Termine J.D.: Noncollagenous protein influencing the local mechanisms of calcification. *Clin. Orthop. Related Res.* 200:362-385, 1985.
  38. Fisher L.W., Hawkins G.R., Tuross N., and Termine J.D.: Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II bone sialoproteins I and II, and osteonectine from the mineral compartment of developing human bone. *J. Cell Biol.* 262:259-265, 1987.
  39. Prince C.W. and Butler W.T.: 1,25-Dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> regulates the biosynthesis of osteonectine, a bone-derived cell attachment protein in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Collagen Rel. Res.* 7:305-313, 1987.
  40. Somerman M.J., Prince C.W., Sauk J.J., Foster R.A. and Butler W.T.: Mechanism of fibroblast attachment to bone extracellular matrix: Role of a 44 kilodalton bone phosphoprotein. *J. Bone Mineral Res.* 2:259-265, 1987.
  41. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
  42. P.A. Levene and F. Medigreceanu, *JBC* 9, 65, 1911.
  43. Robison, R., *Biochem. J.*, 17, 286, 1923.



44. Fleisch H. and Neuman W.F.: Mechanism of calcification: Role of collagen polyposphates and phosphatase. *Am. J. Physiol.* 200:1296-1300, 1961.
45. Whyte M.P., Teitelbaum S.L., Murphy W.A., Bergfeld M.A. and Avioli L.V.: Adult hypophosphatasia: Clinical, laboratory and genetic investigation of a large kindred with review of the literature. *Medicine* 58: 329-337, 1979.
46. C.L. Maeder, D.L.: Carnes and D.T. Graves: Alkaline phosphatase and osteocalcin levels in cells from periodontal explants. *J. Dent. Res.* 67:232 Abst No. 958, 1988.
47. Mitsuhiro Ohshima, Fumiyuki Kuwata, Kichibee Otsuka, Ryozo Saito, Kazuki Sato, Shogo Shioji and Kantaro Suzuki: Alkaline phosphatase activities of cultured human periodontal ligament cells. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, Vol. 30, 208-217, 1988.
48. Kawase T., Sato S., Miake K. and Saito S.: Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. *Adv. Dent. Res.* 2(2): 234-239, 1988.
49. J.E. Piche, D.L. Carnes, Jr. and D.T. Graves: Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J. Dent. Res.* 68(5): 761-707, 1989.
50. Marie Yamada, Aukiko Hirayama and Kiyoshi Miake: Histochemical and cytochemical studies of phosphatases in the bovine periodontal ligament. *Jpn. J. Oral Biol.*, 29:378-385, 1987.
51. Sherwood, L.M., Mayer, G.P., Ramberg, C.F., Kronfeld, D.S., Aurbach, G.D., and Potts, J.T., Regulation of parathyroid hormone secretion: proportional control by calcium lack of effect of phosphatase. *Endocrinology*, 83, 1043, 1968.
52. Reitz, R.E., Mayer, G.P., Deftos, J.L., and Potts, J.T., Endogenous parathyroid hormone response to thocalcitonin-induced hypocalcemia in the cow, *Endocrinology*, 89, 932, 1971.
53. MacDonald, B.R., Gallagher, J.A. and Russell, R.G.G.: Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone. *Endocrinology* 118, 2445-2449, 1986.
54. Van der Plas, A., Feyen J.H.M. and Nijweide, P.J.: Direct effect of parathyroid hormone on the proliferation of osteoblast-like cells: a possible involvement of cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 918-925, 1985.
55. Matthews J.L.: Ultrastructure of calcifying tissues. *Am. J. Anat.* 129:451-458, 1970.
56. Sayegh F.S., Abousy A., Davis R.W., Solomon G.C.: Cellular role in hard tissue mineralization. *Anat. Rec.* 178:457, 1974.
57. Matthew J.L., Martin J.H., Sampson H.W., Kunin A.S., Roan J.H.: Mitochondrial granules in the normal and rachitic rat epiphysis. *Calcif. Tiss. Res.* 5:91, 1970.
58. Muhoz C.O.G., Leblond C.P.: Deposition of calcium phosphate into dentin and enamel as shown by radiography of sections of incisor teeth following injection of <sup>45</sup>Ca into rats. *Calcif. Tiss. Res.* 15:221-235, 1974.
59. Reith E.J., Boyde A.: The enamel organ: A control gate for calcium influx into the enamel. *J. Dent. Res.* 58 (Spec. Issue B): 980, 1979.
60. Sayegh F.S., Porter K., Sun G.: Calcium uptake by tooth germ cells. Factors and mechanisms influencing bone growth, 135-142, 1982.
61. Shaw K.Y., Tang Jj. S., Chao C.F.: Functional evaluation of cultured rabbit osteo-

blast-like cells. Proc. Natl. Sci. Counc.  
Repub. China: 13(3): 192-200, 1989.  
62. Brunette D.M., Melcher A.H. and Moe H.K.:  
Culture and origin of epithelium-like and

fibroblast-like cells from porcine periodontal  
ligament explants and cell suspensions.  
Arch Oral Biol. Vol 21:393-400, 1976.

— ABSTRACT —

## BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS IN VITRO

**Soung-Wook Cho**, D.D.S., M.S.D., **Kyung-Suk Cha**, D.D.S., M.S.D., Ph. D.

*Dept. of Orthodontics College of Dentistry, Dankook University*

To find out the differences between periodontal ligament cells (PDL cells) and gingival fibroblast cells (GFB cells), alkaline phosphatase, a marker enzyme for osteoblast, was used to measure the activities and  $^{45}\text{CaCl}_2$  isotope was used to find out cellular and release of  $^{45}\text{Ca}$ , a requisite for bone formation. PDL cells and GFB cells from 1 to 5 passages were also measured in alkaline phosphatase activity assay.

By the use of above methods, followings were concluded that the PDL cells and the GFB cells have characteristics that are different from each other. In that PDL cells showed large amount of calcium uptake and large amount of calcium release in initial stage, they seem to possess characteristics which are similar to osteoblast-like cells.

1. The PDL cells, in contrast to the gingival fibroblast, showed exceedingly high alkaline phosphatase activity which was highest at the second passage, decreasing thereon. But gingival fibroblasts cells showed no distinct differences in alkaline phosphatase activity as the passage were elapsed.
2. For both PDL cells and GF cells, the  $^{45}\text{Ca}$  uptake was greatest at 2 hours period. The PDL cells showed higher measuring than GFB cells through out the whole time period.
3. Whereas the GFB cells showed slow increase of  $^{45}\text{Ca}$  release as time relapsed, the PDL cells showed rapid increase of  $^{45}\text{Ca}$  release.