

PDGF와 TGF- β 1이 배양 인체 치은 섬유모세포와 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 치주과학교실

정순규 · 남궁혁 · 신형식

I. 서 론

치주질환에는 치은염증과 이에따른 치아주변의 지지 치조골과 결합조직의 상실에 의한 치주낭의 형성이 유발된다¹⁾. 이러한 치주질환에 대한 치주치료후 일반적인 치유양상은 치은 결합조직과 치근면 사이에서 치은 상피세포의 근단 방향으로의 이동이다. 치유의 과정중 상피의 개재는 노출된 치근면에 치주인대 세포의 부착을 방해하고 이에따른 이상적인 치주조직의 재생을 방해하게 된다. 그러므로 치주질환으로 인해 상실된 치주조직의 재생은 치유되는 치주창상부위로부터 치은 결합조직과 상피의 배제가 요구된다. 이를 위해서는 치주인대의 전구세포가 노출된 치근면 상으로 이주하여 부착되며 조직화되고 또한 성숙되어야 한다²⁾.

이러한 이상적인 치주병소의 치유를 위해 과거에 많은 연구가 진행되어 왔고 물리적 차단막(mechanical barrier)을 이용한 조직유도 재생술(Guided Tissue Regeneration Technique)이 많이 시행되어 왔다³⁾. 이 방법을 이용해 상피가 치근면으로 하방 이주하는 것을 방지함으로써 치근면으로 치주인대세포가 이주하기 위한 공간 및 기회를 확보하며, 치근흡수 및 유착(ankylosis)을 유발하는 것으로 알려진^{4,5)} 치은 섬유모세포의 치근면으로의 이주를 방지하여 신부착 형성을 유도한다.

최근 신부착을 유도하는데 있어 또다른 시도가 행하여지고 있는데 이는 polypeptide gro-

wth factor라고 알려진 분자집단을 이용한 치주인대세포의 이주, 부착 및 증식의 도입이다. 즉, 치주인대 세포가 노출된 치근면으로 이주하여 부착되고나서 조직화되고 기능적 섬유성 부착기구로 증식과 성숙을 하게 됨에 따라 골전구세포 또한 치주인대세포의 증식과 함께 이주, 증식 그리고 성숙이 되도록 한다. 이러한 polypeptide growth factor 중 platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF), transforming growth factor(TGF) 그리고 epidermal growth factor(EGF)등이 치주창상의 치유에 있어 중요한 역할을 담당한다. 이들 polypeptide growth factor 중 가장 널리 연구가 행하여진 platelet-derived growth factor(PDGF)는 약 30,000 Da의 분자량을 가지는 조절 단백질이다⁶⁻⁹⁾. 이는 2개의 disulfide-bonded polypeptide chain으로 구성되며, homodimer form(PDGF-AA, PDGF-BB)과 heterodimer form(PDGF-AB)으로 분류된다^{10,11)}. PDGF의 기원은 혈소판의 alpha granule이지만¹²⁾ 단핵세포, 대식세포, 내피세포 및 골기질 등에서도 발견된다¹³⁻¹⁶⁾. Growth factor중 특히 PDGF의 기능에 대해 많은 연구가 있었는데 이것은 섬유모세포, 평활근 세포 그리고 골세포¹⁷⁻²⁰⁾ 등과 같은 간엽세포 기원의 세포들을 자극하는 것으로 알려졌다. Hart등²¹⁾과 Lynch등²²⁾에 따르면 PDGF-AB heterodimer와 PDGF-BB homodimer는 유사한 세포분열 활성화와 효능을

갖지만 PDGF-AA homodimer는 다른 범위의 활성도와 더 낮은 potency를 갖는 것으로 보고되었다. 이러한 PDGF는 실험실에서 치주인대세포의 활성화에 유의한 증가를 보이며²⁵⁾, Blom²⁶⁾은 PDGF가 대조군에 비해 최대 274%의 DNA합성의 증진을 보이는 것으로 보고하였다.

또다른 polypeptide growth factor의 일종인 TGF(Transforming Growth Factor)는 TGF- α 와 TGF- β 로 분류되며 이들은 각기 정상과 신생 조직으로부터 분리되었으며 구조적, 기능적으로 서로 관련이 없다. TGF- α 는 약 5,600 Da의 분자량을 가진 50-amino-acid single-chain protein이며²⁵⁾, EGF(epithelial growth factor)와 42%의 동질성을 가지고 EGF 수용기에 경쟁적으로 작용하며 상피세포와 내피세포를 자극한다^{26,27)}. TGF- β 는 25,000 Da의 분자량을 가진 dimeric polypeptide로서 TGF- β 1, TGF- β 2 및 TGF- β 3의 3가지 형태로 구분되며 골과 혈소판이 주요 기원이다²⁸⁻³⁰⁾. 이는 상피세포의 증식을 억제하고 간엽세포의 증식을 자극하며^{31,32)}, 섬유모세포의 화학주성 능력과 증식을 자극하며 세포외기질의 생성을 유도한다^{33,34)}. 또한 TGF- β 는 실험실의 배양조건에 따라 조골 세포 증식에 억제^{35,36)}와 자극³⁷⁾의 상반된 효과를 보인다. TGF- β 는 다른 PDGF, IGF, FGF 등의 polypeptide growth factor와 함께 적용시 상승작용(synergistic effects)을 보이는 것으로 알려졌다. Piche³⁸⁾에 따르면 TGF- β 는 치은 섬유모세포의 증식에 효과가 없었으나 PDGF는 치은과 치주인대 섬유모세포의 증식을 증가시킨다고 보고하였고, Oates³⁹⁾에 따르면 TGF- β 가 PDGF의 반응을 조절하여 치주인대 섬유모세포의 증식을 자극하게 하는 것으로 나타났다.

이와같은 TGF- β 의 단독사용 및 복합사용시의 상반된 작용 때문에 PDGF와 복합사용시 혹은 TGF- β 와 PDGF를 여러 농도에서 단독으로 사용하였을 경우의 증식효과를 결정하는 것이 필요하며, 이들 각각이 치은 및 치주인대 섬유모세포에 각각 미치는 영향에 관한 보다 자세한 평가가 요구된다.

본 연구의 목적은 동일한 환자로부터 얻어진

치주인대세포와 치은섬유모세포에 TGF- β 와 PDGF를 단독 혹은 복합사용시 이들이 세포의 형태 및 활성화에 미치는 영향을 평가하여 TGF- β 와 PDGF의 치주재생에 있어서의 역할 및 이들 성장인자에 대한 치은 섬유모세포와 치주인대세포 활성의 차이점을 평가한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) PDGF와 TGF- β 의 준비

Human recombinant PDGF-AB(P-6559, Sigma Chemical Company, USA)는 SDS-PAGE에 의해 95% 이상의 순도를 가지며, 이의 생물학적 활성은 ³H-thymidine으로 Swiss 3T3 cell에 대해 평가되었다. 이는 실험에 이용된 0.01-20ng/ml 범위의 농도로 희석하기 위해 사용직전 10% FBS가 함유된 α -MEM에 희석하여 사용하였다.

Human recombinant TGF- β 1(T-7164, Sigma Chemical Company, USA)은 silver-stained SDS-PAGE에 의해 97% 이상의 순도를 가지며, 0.01-20ng/ml 농도로 실험에 이용하기 위해 4mM HCl을 함유한 배양액으로 stock solution을 만든다음 실험직전 각 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 치은 섬유모세포와 치주인대세포의 배양
본 연구에서 이용된 결체조직은 교정 목적으로 발치를 시행한 소구치나 제3대구치의 건강한 치은과 치주인대를 절제하여 얻어졌다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태는 임상 및 방사선적으로 평가되었는데, 임상적으로 치태지수, 치은지수 및 부착상실을 평가하여 치태 및 치은지수가 1 이하이고 부착상실이 3mm 이하인 경우를 선택하였다. 한편 방사선 사진상으로 치조골의 소실이나 치근단병소가 없는 치아이며 치아우식 또한 없는 경우를 선택하였다. 발치한 치아로부터 절제한 치은조직과 치근의 중간 1/3 부위에서 절제한 치주인대조직은 40% 우태아 혈청(Fetal bovine serum, Gibco Co., USA)가 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, am-

photicin B 포함, Gibco co., USA)를 가한 α -MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co., USA)으로 3회 세척하였다. 치은 및 치은인대 조직을 세척한 후 60mm 세포배양용 배양접시(Nunc Co., USA)로 옮겨 약 1mm²로 세절하였다. 세절한 조직은 20분간 37도 5%CO₂, 습도 100% 배양기(Bantex 1820IR, SHEL-LAB, USA)에서 배양접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 2ml의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 첨가한 α -MEM을 가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일간격으로 배양액을 교환하였다.

3일간 배양후 배양접시내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution, GIBCO Co. USA)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한 후 0.25% Trypsin/EDTA (10x, Gibco Co., USA)를 배양접시당 2ml씩 넣고, 3분간 bench상에 방치한 후 배양접시에 부착된 부착세포를 분리시키고 5ml 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원심하였다. 원심후 상청액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한 후 Vortex mixer로 혼합하고 세포부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2 혹은 3일 간격으로 교환하였다. 모든 세포들은 섬유모세포의 형태 및 증식율을 보였고, 본 실험에서는 5회 내지 8회 계대배양한 치은섬유모세포와 치주인대세포를 이용하였다.

2. 연구방법

1) 대조군과 실험군 설정

5회 계대 배양된 치은섬유모세포와 치주인대세포는 24-well plate에 분주하기 전 trypan-blue로 염색한 후 hemocytometer에 옮겨 도립현미경 상에서 세포수를 세어서 well당 10,000개의 세포수로 부착이 되도록 분주하고 1일간 배양을 실시하였다.

실험군은 0.01, 0.1, 1, 10 및 20ng/ml 농도의 PDGF와 TGF- β 를 단독으로 가한군과 0.1, 1 그리고 10ng/ml 농도의 PDGF와 TGF-

β 를 동시에 가한군으로 선정하였다. 한편 PDGF와 TGF- β 를 희석하는데 이용된 용액을 대조군으로 선정하였으며, 각 군은 4배수로 실험을 행하였다.

2) 도립현미경(inverted microscope) 검사
0.01, 0.1, 1, 10 및 20ng/ml 농도의 PDGF와 같은 농도의 TGF- β 를 단독 혹은 복합으로 well당 1ml씩 가한 후 3일간 배양하여 이를 농도별로 분류한 다음 도립현미경(IMT2-21, Olympus, Japan)을 이용하여 세포의 형태를 관찰하였다.

3) 세포활성도 검사

상기와 같이 계대배양한 치은섬유모세포와 치주인대세포 중 동일한 사람 및 동일한 계대에 있는 세포를 선택하여 실험 전일 분주한 다음 1일간 배양하고 상기 농도의 PDGF와 TGF- β 를 단독 혹은 복합하여 가한 후 1, 2 그리고 3일간 배양한 후, 세포활성도를 측정하기 위해 생리식염수에 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA) 용액 50 μ l씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 세포활성도의 측정을 위해 96-well plate상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣고 630nm를 기준으로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 각 growth factor를 희석한 용액을 대조군으로 하여 세포활성도는 대조군의 백분율로 산출하였다.

4) 통계분석

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포활성의 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석 하였다.

III. 연구결과

1. PDGF와 TGF- β 가 치은섬유모세포와 치주인대세포의 형태에 미치는 영향

도립현미경으로 관찰한 치은섬유모세포와

A

B

C

D

Figure 1. Effects of PDGF and TGF - β 1 on morphology of human gingival fibroblast and periodontal ligament cell at third day. A) Control group(MEM), B) 10ng/ml PDGF added on periodontal ligament cell, C) 10ng/ml TGF - β 1 added on gingival fibroblast, D) 10ng/ml PDGF and TGF - β 1 added on gingival fibroblast.

치주인대세포의 형태는 배양액만을 가한 군과 성장인자를 가한 군 사이에 있어 세포의 형태에 있어 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 각 군의 세포들은 단일층의 세포 형성, 세포분열시 밀도에 따른 억제, 세포의 부착, 방추형 혹은 성상의 형태, 둥글어지고 확장된 핵 및 평행하고 불규칙한 분포의 세포의 배열을 보였다(Fig. 1. A - D).

2. MTT assay를 이용한 세포활성도의 평가

1) PDGF를 단독으로 가한군

PDGF를 단독으로 가한 경우 치은 섬유모세포는 배양 2일째에 0.1-20ng/ml 범위 모두에서 대조군에 비하여 유의한 세포활성을 보였

으나($P < 0.05$), 배양 3일째에 대조군과 유의성이 나타나지 않는 수준으로 세포활성의 감소를 보였다($P > 0.05$). 반면, 치주인대 세포는 배양 2일까지 세포활성의 유의한 증가를 보이지 않았으나, 배양 3일째에 10과 20ng/ml의 농도에서 각기 146.30 ± 7.85 와 145.66 ± 5.80 로 대조군에 비하여 유의한 세포활성도의 증가를 보였다($P < 0.05$)(Table 1).

한편, 치주인대 세포의 경우 10과 20ng/ml를 가한 군에서 배양 2일 이후 대조군에 비하여 유의한 수준의($P < 0.05$) 세포활성도의 상승경향을 보인 반면(Fig. 2A), 치은 섬유모세포의 경우 배양 전체 농도에서 배양 2일째까지 세포활성의 상승경향을 보이나 2일 이후부터 세포활성의 감소경향을 보여 실험농도 전체에서

Table 1. Effects of PDGF on Cell Activity of Human Gingival fibroblast and Periodontal Ligament Cell(Mean%± S.D.).

	1st day		2nd day		3rd day	
	PDL	GF	PDL	GF	PDL	GF
Control	100.00± 14.30	100.00± 6.93	100.00± 5.67	100.00± 4.65	100.00± 7.33	100.00± 8.55
0.1ng/ml	109.97± 14.16	109.06± 11.64	96.00± 2.27	142.03± 17.82 *	107.25± 2.72	105.90± 11.18
1ng/ml	146.20± 6.80 *	105.23± 21.83	89.60± 1.83	143.33± 14.25 *	113.45± 5.94	101.76± 9.43
10ng/ml	104.37± 1.34	114.17± 14.26	109.23± 7.52	168.70± 9.28 *	146.30± 7.85	114.00± 11.82
20ng/ml	95.67± 4.10	144.17± 8.38 *	98.73± 0.58	176.15± 3.75 *	145.66± 5.80 *	108.00± 13.09

* : Significantly different from control group(P<0.05)

PDL : Periodontal ligament cell

GF : Gingival fibroblast

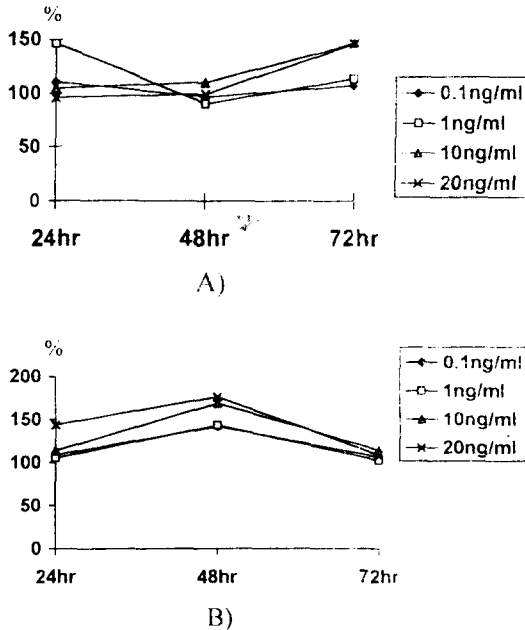


Figure 2. Effects of PDGF on Cell Activity of
A) Periodontal Ligament Cell ; B)
Human Gingival Fibroblast

대조군 수준의 세포활성도를 나타내었다(Fig. 2B).

2) TGF-β가 치은섬유모세포와 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

TGF-β를 치주인대세포에 가한 경우 배양 3일째에 1, 10 그리고 20ng/ml의 농도에서 각기 130.09 ± 5.05 , 168.54 ± 8.84 및 $180.85 \pm 8.90\%$ 로 대조군에 비하여 유의한 수준의 세포활성도의 증대를 보였다(Table 2). 한편 0.1과 1ng/ml의 농도에서는 배양 전 기간동안 완만한 증가양상을 보이거나, 10과 20ng/ml의 농도의 경우는 배양 2일 이후 높은 세포활성도의 상승 경향을 보였다(Fig. 3 A, B).

치은섬유모세포에 TGF-β를 가한 군에서는 배양 3일째에 20ng/ml의 농도에서 $88.77 \pm 2.50\%$ 로 대조군에 비하여 유의한 수준의 세포활성의 감소를 보였으며, 기타농도에서는 대조군 수준의 세포활성도를 보였다(Table 2).

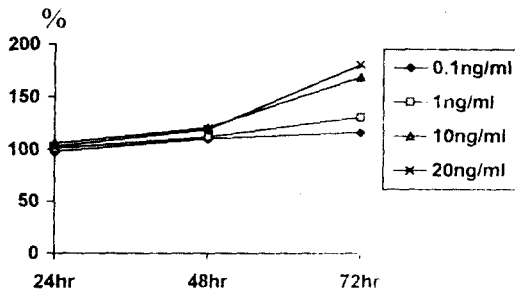
Table 2. Effects of TGF- β on Cell Activity of Human Gingival Fibroblast and Periodontal Ligament cell(Mean% \pm S.D.).

	1st day		2nd day		3rd day	
	PDL	GF	PDL	GF	PDL	GF
Control	100.00 \pm 15.63	100.00 \pm 8.00	100.00 \pm 5.67	100.00 \pm 6.00	100.00 \pm 7.33	100.00 \pm 3.00
0.1ng/ml	97.75 \pm 4.14	123.50 \pm 34.65	109.97 \pm 15.65	95.00 \pm 4.28	115.67 \pm 3.72	120.83 \pm 11.38
1ng/ml	100.60 \pm 11.45	103.25 \pm 8.13	111.80 \pm 4.85	60.53 \pm 5.59	130.09 \pm 5.05*	122.53 \pm 5.37
10ng/ml	105.40 \pm 7.48	95.50 \pm 17.11	120.13 \pm 11.75	*107.10 \pm 19.92	168.54 \pm 8.84*	100.75 \pm 11.82
20ng/ml	102.50 \pm 4.10	97.80 \pm 0.99	110.70 \pm 6.47	88.40 \pm 16.40	180.65 \pm 8.90*	88.77 \pm 2.50*

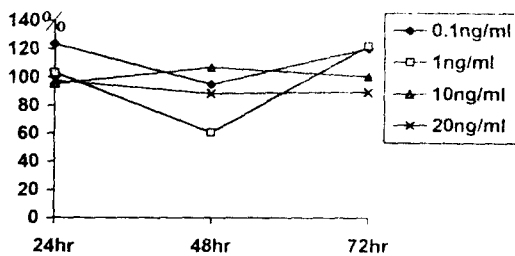
* : Significantly different from control group(P<0.05)

PDL : Periodontal ligament cell

GF : Gingival fibroblast



A)



B)

Figure 3. Effects of TGF on Cell Activity of
A) Periodontal Ligament Cell ; B)
Human Gingival Fibroblast

3) PDGF와 TGF- β 를 동시에 가한 경우 치은섬유모세포와 치주인대세포의 활성

PDGF와 TGF- β 를 치주인대세포에 동시에 가한 경우 0.1, 1, 10ng/ml의 농도에서는 배양 3일째에 각각 124.09 \pm 3.85, 177.80 \pm 6.85 및 181.09 \pm 8.85로 대조군에 비하여 유의하게 높은 세포활성의 증가를 보인 반면, 치은섬유모세포에 이들을 혼합하여 가한 경우 배양 3일째에 10ng/ml의 농도에서 89.50 \pm 1.82%로 대조군에 비하여 유의한 수준의 세포활성의 감소를 보였다(Table 3).

치주인대 세포의 경우 배양 2일 이후 세포활성의 증가경향을 보이나 치은 섬유 모세포는 PDGF와 TGF- β 를 동시에 가한 경우 배양 2일째 증가하였던 세포활성이 대조군 수준으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4A, B).

한편, PDGF와 TGF- β 를 동시에 가한 군은 치주인대세포의 경우 PDGF 혹은 TGF- β 를 단독으로 가한 군에 비하여 유의한 수준의 세포활성도의 증가를 보였으며, 치은 섬유모세포의 경우 20ng/ml의 농도에서 PDGF를 단독으로 가한군에 비하여 유의한 수준의 세포활성의 감소를 보였다(P<0.05)(Fig. 5 A, B).

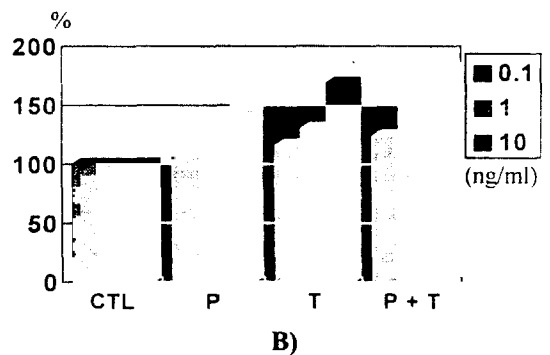
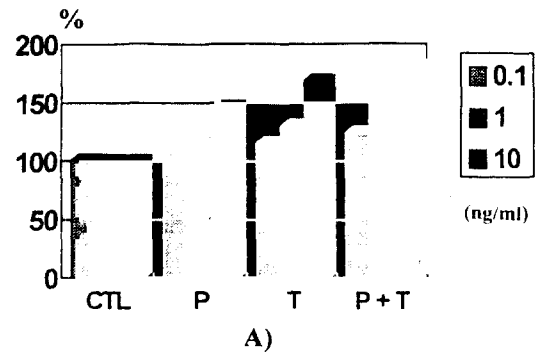
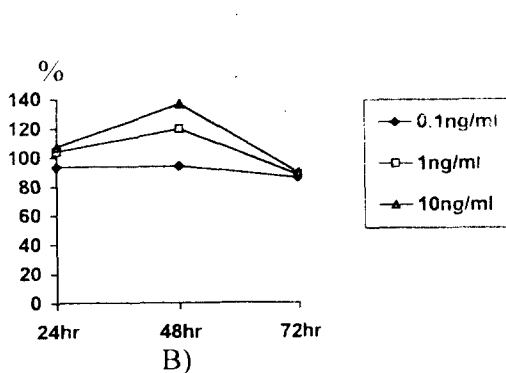
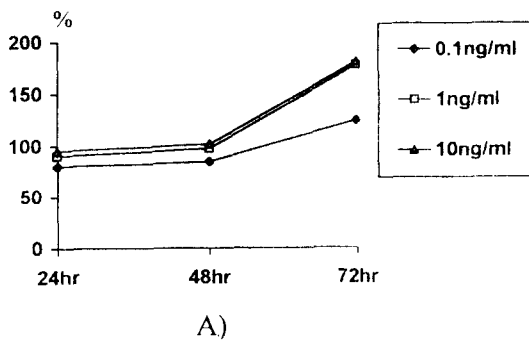
Table 3. Effects of PDGF and TGF - β on Cell Activity of Human Gingival Fibroblast and Periodontal Ligament Cell(Mean% \pm S.D.).

	1st day		2nd day		3rd day	
	PDL	GF	PDL	GF	PDL	GF
Control	100.00 \pm 4.30	100.00 \pm 6.93	100.00 \pm 9.00	100.00 \pm 5.67	100.00 \pm 5.34	100.00 \pm 8.55
0.1ng/ml	79.60 \pm 9.22	93.57 \pm 1.28	84.07 \pm 5.37	93.97 \pm 4.48	124.09 \pm 3.85 *	85.67 \pm 6.40
1ng/ml	89.85 \pm 5.15	103.67 \pm 1.61	97.23 \pm 3.17	119.40 \pm 18.23	177.80 \pm 6.85 *	87.80 \pm 8.43
10ng/ml	94.67 \pm 1.12	107.20 \pm 3.47	101.50 \pm 6.29	136.63 \pm 18.43	181.09 \pm 8.85	89.50 \pm 1.82

* : Significantly different from control group(P<0.05)

PDL : Periodontal ligament cell

GF : Gingival fibroblast



P : PDGF T : TGF - β

Figure 4. Effects of PDGF and TGF on Cell Activity of A) Periodontal Ligament Cell ; B) Human Gingival Fibroblast

Figure 5. Comparison of Various Effects of PDGF and TGF - β on Cell Activity of A) Periodontal Ligament Cell ; B) Gingival Fibroblasts at 3rd day

IV. 총괄 및 고찰

앞선 선학들의 연구 결과를 통해 polypeptide growth factor가 치주병소의 치유에 있어 보조적 수단으로 도입될 수 있는 가능성이 제시되었다. 일반적인 창상치유 양상과는 달리 치주병소의 치유에 있어서 상피의 하방증식은 반드시 억제되어야 한다. 즉, 상피 및 치은 결합조직의 치근면으로 이주 및 증식이 억제되어야만 하고 이를 억제하는 가운데 치주인대세포가 이주 및 증식되어야 하는데, 이러한 치유의 원칙에 있어서 주요 조절대상 세포는 치은 섬유모세포와 치주인대세포이다.

치주인대세포는 치은 섬유모세포와 다른 독특한 종류의 결합조직세포이다. 이들은 풍부한 세포외기질 합성 활성을 갖는 고도로 조직화된 cellular organelle을 지닌 고도의 cellular polarization을 보이며^{38,40)}, 매우 높은 교원질 합성율을 보이고 신생 교원질 분자의 중합에 가장 효과적이며⁴¹⁾, 조골기능을 지니며⁴²⁻⁴⁴⁾, 백악질 생성에 관여하는 기능을 갖는다고 알려졌다. 본 연구에서도 이들 치주인대세포는 일부 polypeptide growth factor에서 치은섬유모세포와는 다른 성장양상을 보였다.

선학들의 연구에서 PDGF와 TGF- β 가 세포에 미치는 영향에 대한 많은 보고가 있었는데, Pfeilschiffer등은 백서의 두개골 배양시 골기질 침착에 대한 TGF- β 1의 효과를 평가하였는데, 2.5에서 250ng/ml 사이의 농도에서 용량의존형 반응을 보였고 PDGF는 32에서 320ng/ml의 범위에서 용량의존형 반응을 보였다고 보고하였다. 또한 Bryckaert등은 10-20ng/ml의 PDGF가 골수 섬유모세포의 증식을 최대한 자극하였으며⁴⁵⁾, PDGF에 10ng/ml의 TGF- β 1의 첨가는 증식을 방해한 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 PDGF와 TGF- β 가 단독 혹은 동시에 가해진 경우 치은섬유모세포와 치주인대세포의 증식에 있어 서로 다른 효과를 보여 이 두 가지 성장인자가 치은섬유모세포와 치주인대세포에 선택적 증식 반응을 보일 수 있는가를 평가하기 위해 이들의 초기증식양상 평가에 목적을 두었다.

본 연구에서 PDGF와 TGF- β 1을 가한 후 치주인대세포와 치은섬유모세포의 형태를 관찰한 결과 배양액만을 가한 대조군과 유사한 세포 형태를 보였으며, 농도에 따른 세포형태 또한 형태의 차이가 나타나지 않았는데, 이 결과는 이들이 생리적 농도를 초과할지라도 세포독성을 지니지 않는다는 것을 의미한다.

Dennison등⁴⁶⁾은 TGF- β 의 치주인대 세포에 대한 특이적인 세포활성의 증대를 보고하였다. 본 연구에서는 PDGF와 TGF- β 를 치은섬유모세포와 치주인대세포에 가한 경우의 세포활성의 평가에서 PDGF와 TGF- β 를 가해진 치은섬유모세포와 치주인대세포에서 서로 다른 결과가 나타났는데, PDGF를 단독으로 가한 군에서는 배양기간에 따라 치주인대 세포는 활성이 점차 높아지고 치은섬유모세포는 세포활성이 배양 2일까지는 증가되었고 그 이후부터 대조군 수준으로 감소되는 경향을 보였다. 반면, TGF- β 를 단독으로 가한 경우는 배양 1일째에 대조군 수준의 세포활성을 보이나 배양시간이 지날수록 치주인대세포의 활성은 증가되어 배양 1일째부터 전체 배양기간 동안 치주인대 세포에 비하여 유의한 세포활성의 증대는 보이지 않았다. 이로 미루어 볼 때 TGF- β 는 세포증식에 미치는 효과가 느리지만 치은섬유모세포의 활성에는 큰 영향을 미치지 않으면서 치주인대세포의 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 한편, Matsuda등⁴⁷⁾은 백서의 치주인대세포를 이용한 PDGF-AB와 TGF- β 의 thymidine uptake assay를 실시한 보고에서는 TGF- β 를 단독으로 가한 경우 치주인대세포의 증식반응의 감소를 보였다. 이러한 TGF- β 의 기능에 대한 많은 연구보고에서 서로 상반된 결과들이 나타났는데, 이는 세포배양시의 세포선택과 사용한 TGF- β 의 종류의 불일치 및 실험방법의 차이 때문인 것으로 사료된다.

한편, TGF- β 는 다른 여러 종류의 Polypeptide growth factor의 기능을 조절하는 것으로 알려졌는데, Ishikawa⁴⁸⁾등은 TGF- β 1이 PDGF에 대한 섬유모세포 조절기전에 대한 보고에서 TGF- β 1은 어떤 세포에서는 PDGF 수용기를 증가시키며, PDGF mRNA를 생산하여

해당 세포의 수용기 발현을 통해 외인성 PDGF에 더욱 민감한 반응을 보이도록 하고 동시에 PDGF의 수준을 증가시킨다고 보고하였다. 이와같은 TGF- β 와 PDGF를 복합투여시 TGF- β 1 단독으로 가하는 경우 보다 백서의 창상 치유 모델에서 유의하게 높은 수준의 교원질 침착을 증가시킨 것으로 보고되었고⁴⁹⁾, Pfeilschiffer 등은 이들의 복합투여시 조골세포 유사세포에 대한 화학투성 반응이 증가되었다고 보고하였다. 본 실험에서 이들 PDGF와 TGF- β 1을 동시에 가할 경우 치주인대세포는 PDGF 혹은 TGF- β 1을 단독으로 가한 경우보다 치주인대 세포의 활성은 증가되며 치은섬유모세포는 대조군 이하수준의 세포활성을 보여 치주창상부위에서의 치유과정에 있어 신부착 유도에 단독으로 사용시보다 더욱 유용할 것이다. 또한, 본 연구에 이용된 polypeptide growth factor는 인체에서 추출하여 재조합(recombinant)한 종류인데, 실험실에서 이들이 세포활성의 증가에 미치는 영향이 명백하여 짐으로서 치주조직의 재생을 도모하기 위한 임상적 적용에 있어 더욱 유용해질 것으로 사료된다.

향후에는 이상과 같은 PDGF와 TGF- β 의 생체실험 및 적절한 농도선택 그리고 대량생산 방법의 개발을 통한 신부착 향상술식에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

Polypeptide growth factor의 일종인 PDGF와 TGF- β 이 치은섬유모세포와 치주인대세포의 형태에 미치는 영향을 평가하고자 도립현미경을 이용한 세포 형태의 관찰 및 MTT assay를 이용한 세포활성도를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PDGF를 단독으로 가한 경우 배양 3일째에 치은섬유모세포에 비해 치주인대세포에서 유의한 세포활성의 증가를 보였다.
2. TGF- β 를 단독으로 가한 경우 치은섬유모세포는 배양기간동안 대조군 수준의 세포활성을 보였으나, 치주인대 세포는 농도 및 배양기간이 증가할수록 세포활성이 증가하

였다.

3. PDGF와 TGF- β 를 동시에 가한 경우 치주인대 세포의 활성은 배양 3일째에 유의하게 증가하였으나, 치은섬유모세포는 배양 2일째와 비교하여 세포활성의 유의한 감소를 보였다.
4. PDGF와 TGF- β 를 치주인대세포에 동시에 가한 경우 1과 10ng/ml의 농도에서 단독투여시보다 높은 세포활성을 보였다.

이상과 같은 연구 결과를 종합하여 볼 때 적절한 농도의 PDGF와 TGF- β 의 복합사용은 치주인대세포와 치은섬유모세포의 조절을 통한 치주창상의 치유시 신부착 형성에 있어 보조적 수단이 될 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Caton JG, Nyman S, Zander HA. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regeneration procedures. *J Clin Periodontol* 7 : 224-231, 1993.
2. Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissue. *J Periodont Res* 22 : 233-242, 1987.
3. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, et al. New attachment formation in human periodontium by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 13 : 604-612, 1985.
4. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *J Clin Periodontol* 11 : 41-52, 1984.
5. Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on the teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol* 12 : 51-60, 1985.
6. Antoniades HN. Human platelet - driven growth factor(PDGF) : purification of PDGF - I and PDGF - II and separation

- of their reduced subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7314–7317, 1981.
7. Deuel TF, Huang JS, Proffitt RT, Baenzinger JU, Chang D, Kennedy BB. Human platelet - driven growth factor, purification and resolution into two active protein fraction. *J Biol Chem* 256 : 8896–8899, 1981.
 8. Heldin CH, Backstrom G, Ostman A et al. Binding of different dimetric forms of PDGF to human fibroblasts ; evidence for two separate receptor types. *EMBO J* 7 : 1387–1393, 1988.
 9. Raines EW, Ross R. Platelet - derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem* 257 : 5154–5160, 1982.
 10. Antoniades HN, Hunkapiller MW. Human platelet - derived growth factor(PDGF) ; amino terminal amino acid sequence. *Science* 220 ; 963–965, 1983.
 11. Hammacher A, Hellman U, Johnsson A et al. A major part of purified from human platelet is a heterodimer of one A and one B chain. *J Biol Chem* 263 ; 16493–16498, 1988.
 12. Westermarck B, Heldin, C - H, Ek et al. Biochemistry and biology of platelet derived transforming growth factor. In : Guroff G, et. Growth and maturation factors, vol. 1. New York : Wiley & Sons, 73–115, 1983.
 13. Rappolee DA, Mark D, Banda Mj et al. Wound macrophage express TGF - alpha and other growth factors in vivo : analysis of mRNA phenotyping. *Science* 241 : 708–712, 1988.
 14. Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville - Golden J et al. Injury induces in vivo expression of platelet derived growth factors(PDGF) and PDGF receptor in RNA's in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 565–269, 1991.
 15. Sitaras NM, Sariban E, Pantagis P et al. Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet derived growth factor(PDGF) and synthesize PDGF - like mitogen. *J Cell Physiol* 132 : 376–380, 1981.
 16. Hauschka PC, Mavakos AE, Iafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. *J Biol Chem* 261 : 12665–12674, 1986.
 17. Antoniades HN, Owen AJ. Growth factors and regulation of cell growth. *Annu Rev Med* 33 : 445–463, 1982.
 18. Hintz RL, Liu F. Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin. *J Clin Endocrinol Metab* 45 : 988–995, 1977.
 19. Ross R, Raines EW. Bowen - Pope F. The biology of platelet - derived growth factor. *Cell* 46 : 155–169, 1986.
 20. Stiles CD. The molecular biology of platelet - derived growth factor. *Cell* 33 : 653–659, 1983.
 21. Hart CE, Frostrom JW, Kelly JD et al. Two classes of PDGF receptors recognize different isoforms of PDGF. *Science* 240 : 1529–1531, 1988.
 22. Lynch SE, Williams RC, Polson AM et al. A combination of platelet - derived and insulin - like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 16 : 545–548, 1989.
 23. Thoms W. Oates, Cheryl A. Rouse, and David L. Cochran. Mitogenic effect of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontal* 65 : 142–148, 1993.
 24. Blom S, Holmstrup P, Dabelsteen E. A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet - derived growth

- factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast - like cell's DNA synthesis and morphology. *J Periodontol* 65 : 373-378, 1994.
25. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY et al. Human transforming growth factor - beta cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* 316 : 701-705, 1985.
 26. Burgess AW, Epidermal growth factor and transforming growth factor - alpha. In : Waterfield MD, ed. *Growth factor*. *Br Med Bull* 45(2) : 401-424, 1981.
 27. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Goeddel DV. The murine transforming growth factor - beta precursor. *J Biol Chem* 261 : 4377-4379, 1986.
 28. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor beta in human platelets. *J Biol Chem* 258 : 7155-7160, 1983.
 29. Frolick CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 3676-3680, 1983.
 30. Roberts AB, Anzano MA, Meyers CA et al. Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochem* 22 : 5692-5698, 1983.
 31. Keski - Oja J, Leof EB, Lyons RM, Coffey RJ Jr, Moses HL. Transforming growth factor and control of neoplastic cell growth. *J Cell Biochem* 33 : 95-107, 1987.
 32. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta. *J Cell Biol* 105 : 1039-1045, 1987.
 33. Postlethwaite AE, Keski - Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 165 : 251-256, 1987.
 34. Ignortz R, Massgugue I, Transforming growth factor - beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol Chem* 261 : 4337-4345, 1986.
 35. Antosz ME, Bellows CG, Aubin JE. Effects of transforming growth factor B and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 140 : 386-393, 1989.
 36. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast - enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262 : 2896-2874, 1987.
 37. Centrella M, Massague J, Canalis E. Human platelet - derived transforming growth factor - beta stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 119 : 2306-2312, 1986.
 38. Piche JE, Carnes DL, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 68 : 761-767, 1989.
 39. Cho MI, Garant PR. Sequential events in the formation of collagen secretion granules with special reference to the development of segment - long - spacing like aggregates. *Anat Rec* 199 : 309-320, 1981.
 40. Cho MI, McCarthy PR. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex and the secretion of collagen secretory granules by periodontal ligament fibroblasts. *Anat Rec* 199 : 459-471, 1981.
 41. Sodex J, Berkman FA. Bone cell cultures. In : *Methods in Enzymology*, Vo. 145.

- Academic Press ; 303–324, 1987.
42. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodont Res* 25 : 179–185, 1990.
 43. Topham RT, Chieco DJ Jr, Gattone VH, Hinton DA, Klein RM. The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dev Biol* 124 : 532–543, 1987.
 44. Yamashita Y, Sato M, Noguchi T. Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch Oral Biol* 32 : 677–678, 1987.
 45. Bryckaert MC, Lindroth M, Llschimonn A, Tobbelem G, Wasteson A. Transforming growth factor decrease the proliferation of human bone marrow fibroblasts by inhibiting the platelet - derived growth factor binding. *Exp Cell Res* 179 : 311–321, 1988.
 46. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman Barry, Caffesse R. Differential effect of TGF - β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 65 : 641–648, 1994.
 47. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 63 : 515–525, 1992.
 48. Ishikawa O, Leroy EC, Trojanowska M. Mitogenic effect of transforming growth factor beta1 on human fibroblasts involves the induction of platelet derived growth factor - alpha receptor. *J cell Physiol* 145 : 181, 186, 1990.
 49. Lawrence WT, Norton JA, Sporn MB, Gorschboth C, Grotendorst GR. The reversal of an Adriamycin induced healing impairment with chemoattractant and growth factor. *Ann Surg* 203 : 142–147, 1986.

— Abstract —

EFFECT OF PDGF AND TGF - β 1 ON CELL ACTIVITY OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST AND PERIODONTAL LIGAMENT CELL *IN VITRO*

Soon-Kyu Chung, Goong-Hyuk Nam, Hyung-Shik Shin

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

The migration and proliferation of periodontal ligament cells are desired goal of periodontal regeneration therapy. PDGF and TGF - β 1 are well known to regulate the cell activity of mesenchymal origin cell. The purpose of this study was to determine the effects of these growth factors on human gingival fibroblast and periodontal ligament cell activity, and to identify the regulatory effect of TGF - β 1 on the response to PDGF by MTT assay.

Human gingival fibroblast and periodontal ligament cells were cultured from extracted teeth for non - periodontal reason. Cultured human gingival fibroblast and periodontal ligament cells in vitro were treated with polypeptide growth factor PDGF and TGF - β 1 in both a dose and time - dependent manner. Cell morphology were determined by inverted microscope and cell activity were determined by MTT assay.

The result of this study demonstrated that PDGF and TGF - β 1 were not changed the morphology of these cell compared with control group. PDGF or TGF - β 1 increased cell activity of periodontal ligament cell in dose and time dependent manner but gingival fibroblast were decreased to the level of control group at third day. Additionally, incubation with TGF - β 1 addition to PDGF resulted in a enhanced cell activity of PDGF. Therefore, cell activity of gingival fibroblast were not changed compared with control group.

This study demonstrates that PDGF and TGF - β 1 are major mitogens for human periodontal ligament cell in vitro, and TGF - β 1 is a regulator of cell activity to PDGF in human gingival fibroblast and periodontal ligament cell.