

변형성장인자- β_1 이 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식에 미치는 영향

조은경 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주 치료의 최종 목표는 단순히 진행되는 치주 질환을 저지하는 것이 아니라 이미 파괴된 지지조직의 복구 즉, 부착조직의 재생에 두고 있다. 치료후 나타나는 치유양상은 회복, 재부착, 신부착, 재생 등 네 가지로 구분할 수 있으며, 이상적인 치유는 치주질환에 이환된 부위에 신생골, 신생백악질과 함께 새로운 치주인대 섬유가 기능적으로 삽입, 배열되어 재형성된 상태인 재생에 두고 있다.^{1,2,3)} Karring등⁴⁾은 치주조직의 치유과정에서 상피의 치근단 방향으로의 증식이 가장 빠른 속도로 일어나고 상피의 증식을 차단한 상태에서는 치은결합조직, 치주인대세포 순으로 증식 속도가 빠르다고 보고하였다.

치은섬유아세포와 치주인대세포는 치주조직의 치유와 재생에 관여하는 중요한 세포들이다. ⁵⁾ 치은섬유아세포는 미분화중배엽세포로부터 분화되어 치은결합조직의 세포외기질을 분비하고 유지함으로써 치주조직의 치유에 관여하고 있으며,^{6,7)} 치주인대세포는 치주조직의 재생에 필요한 백악아세포, 골아세포, 섬유아세포를 모두 함유하고 있고, 미분화된 중배엽세포들이 분포하여 어떠한 조건이 주어지면 치주인대에 존재하고 있는 모든 결합조직세포로 분화할 수 있는 복합기능을 가지고 있으므로 신부착을 형성하여 치주조직의 재생에 기여한다고 알려져

있다.^{8,9,10)}

치주조직의 재생을 얻기 위하여 임상적으로 다양한 술식들이 제안되고 있으며, 대표적으로 골이식술,^{11,12)} 구연산과 테트라 사이클린을 이용한 치근면의 처리술,^{13,14)} 차단막을 이용한 조직유도 재생술,^{15,16)} 성장인자의 도입등이 있다. 성장인자의 도입에 관하여 Terranova와 Wikesjo¹⁷⁾는 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포의 기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자에 의해 조절된다고 보고함으로써 폴리펩타이드계 성장인자가 치주조직 치유에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라고 시사한 바 있다. Cochran등¹⁸⁾은 미분화된 중배엽세포의 분화에 관계하는 폴리펩타이드계 성장인자로서 변형성장인자(Transforming growth factor), 혈소판 유래 성장인자(Platelet-derived growth factor), 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor), 인슐린유사성장인자(Insulin-like growth factor), 상피성장인자(Epidermal growth factor)등이 있다고 보고하였다. 이 중 변형 성장인자는 혈소판과 거대세포에서 주로 분비되며^{19,20)} 태생기의 유도 조절인자로 작용하고, 다양한 세포의 분화와 재생에 관여하며, 다른 성장인자에 대한 반응을 촉진 혹은 억제한다고 알려져 있다.^{21,22)}

변형성장인자는 NRK(normal rat kidney) 섬유아세포에서 형질전환을 일으키는 원인인자로 밝혀졌으며, α 와 β 로 구분되어진다고 알려져

있다.²³⁾ 변형성장인자- β 의 구조는 2개의 동일한 112개의 아미노산 가닥이 서로 결합되어 있는 이성체 구조로 분자량은 25KD이며, 그 수용체는 각 500-600KD의 분자량을 가지는 2개의 구조물로 이루어져 있다.^{24, 25, 26, 27)}

골조직에 관한 변형성장인자- β 의 연구로 Pfeilschfter등²⁸⁻³²⁾은 변형성장인자- β 가 골아세포에 주성인자로 작용하고, 골기질의 합성을 촉진시킨다고 보고하였으며,^{33, 34)} Mundy등³⁵⁾은 변형성장인자- β 는 골조직에 가장 많이 존재하고 있으며, 변형성장인자- β 가 골조직 자체와 골아세포에서 골세포 표면 수용체에 강한 친화력을 가지며, 이에 의해 변형성장인자- β m-RNA의 형성이 촉진됨으로써 변형성장인자- β 를 많이 분비한다고 보고하였고,^{36, 37)} Strong등³⁸⁾은 변형성장인자- β 가 사람의 골아세포에서 I형의 교원질 합성을 촉진시킨다고 보고하였다. Rosen등³⁹⁾은 변형성장인자- β 가 교원질과 연골 당단백의 분비를 유도하며 골흡수에도 관여하여 골조직의 성장과 재형성과정에서 영향을 나타낸다고 보고하였다.⁴⁰⁻⁴³⁾

결합조직에 관한 변형성장인자- β 의 연구로 Fine등,⁴⁴⁾ Overall등^{45, 46)}은 변형성장인자- β 가 섬유아세포에 강력한 화학주성인자로 작용하며, 섬유아세포에서 교원질과 Fibronectin의 합성을 촉진하고 세포의 단백질분해능을 억제함으로써 결합조직의 재생을 촉진한다고 보고하였고,^{47, 48)} Ishikawa등⁴⁹⁾은 배양된 사람의 피부 섬유아세포에 변형성장인자- β 1을 투입시 변형성장인자- β 1 단독으로는 그다지 유의성 있는 세포증식을 나타내지 않았으나, 변형성장인자- β 1으로 전배양후 혈소판 유래 성장인자를 투여하면 혈소판 유래 성장인자에 의해 나타나는 섬유아세포의 증식능이 전반적으로 더 높게 나타난다고 보고하였다.

치주과학영역에서 변형성장인자- β 를 응용한 연구로써는 Matsuda등⁵⁰⁾이 배양된 쥐의 치주인대세포에 변형성장인자- β 를 투여하여 실험하였을 때 치주인대세포의 분열능을 억제한다고 보고하였으며, Oates등⁵¹⁾은 배양된 사람의 치주인대세포에 변형성장인자- β 와 혈소판 유래 성장인자, 인슐린 유사성장인자를 병용투여

하였을 때 변형성장인자- β 는 치주인대세포의 증식을 증가시키며, 변형성장인자- β 의 적용농도에 따라 치주인대세포에 대한 혈소판 유래 성장인자의 세포분열능을 조절한다고 보고하였다. Dennison등⁵²⁾은 사람의 치주인대세포와 치은섬유아세포에 변형성장인자- β 1과 혈소판 유래 성장인자를 단독 적용하고, 또 병용적용하여 배양 하였을때, 적용조건에 따라 두 세포군의 증식능이 차이를 보이며, 치주인대세포의 증식능이 치은섬유아세포에 비해 더 높게 나타난다고 보고하였다.

이상의 연구를 살펴본 결과 변형성장인자- β 1이 골조직대사와 결합조직대사에 관여하는 중요한 성장인자라는 것을 알 수 있었으나, 치주조직재생에 대한 변형성장인자- β 1의 영향은 잘 규명되어 있지 않으므로 이에 본 실험은 초기배양한 치주인대세포와 치은섬유아세포에 각기 다른 농도와 시간에 따른 변형성장인자- β 1을 투여해 봄으로써, 변형성장인자- β 1이 두 세포군의 세포증식능에 미치는 영향과 각 조건에 따른 두 세포군간의 증식능을 상호 비교해 보고자 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1) 실험재료

초기배양한 사람의 치주인대세포와 치은섬유아세포를 이용하였고, 배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 DMEM로 표기)을 사용하였다. fetal bovine serum (Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그의 trypsin, ethylenediamine-tetraacetic acid(이하 EDTA로 표기), phosphate buffered saline(이하 PBS로 표기), bovine serum albumin(이하 BSA로 표기), trichloroacetic acid(이하 TCA로 표기)를 사용하였다. 그리고 [methyl-³H] thymidine(6.7 Ci/mmol) (New England Nuclear사, 미국)과, 사람에게서 추출한 변형성장인자- β 1 (Genzyme사, 미국)을 사용하였다.

2) 치주 인대세포와 치은섬유아세포의 배양 교정치료를 목적으로 내원한 환자의 제 1 소구치 부위의 정상치은을 절제하고, 제 1 소구치를 발거하여 초기 배양과정에서 야기될 수 있는 세균 감염을 방지하기 위해 200U/ml Penicillin (근화제약, 한국)과 200 μ g/ml Streptomycin (동아제약, 한국)이 첨가된 DMEM에 각각 침수시켜 3회 세척후, 치주인대세포의 배양을 위하여 치근 중앙부 1/3 부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절한 다음 35mm 세포배양 접시에 고르게 분포시키고 치은섬유아세포의 배양을 위하여 절제된 정상치은을 세절하여 역시 35mm 배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% FBS에 100U/ml Penicillin과 100ng/ml Streptomycin이 함유된 DMEM을 넣고 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂공기 혼합배양기 (Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 치주인대세포와 치주인대세포가 조직세편으로부터 증식되어 완전히 배양접시를 피개하는 단층밀생이 형성된 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리하여 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였다. 본 실험에서는 4세대에서 6세대 사이의 치주인대세포와 치은섬유아세포를 이용하였다.

3) 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식 및 DNA합성 측정

치주인대세포와 치은섬유아세포의 수가 각각 1x10⁵cell/ml이 되게 24 well culture plates에 넣고 3일간 배양하여 육안적인 밀생상태가 되게 하였다. 그후 세포 배양액을 제거한 세포층을 PBS로 2회 세척 후 1% BSA가 포함된 DMEM으로 교체한 후, 이틀간 세포주기를 정지시켰다. 그 후 변형성장인자- β 1을 첨가하지 않은 군을 대조군으로, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 ng/ml 농도의 변형성장인자- β 1을 첨가한 군을 실험군으로 하여, 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였으며, 각 시간별 배양 24시간 전에 1 μ Ci/ml [³H]-thymidine을 첨가하여 [³H]-thymidine이 DNA내로 편재되는 속도로써 두 세포군의 증식능을 측정하였다.

[³H]-thymidine이 DNA내로 편재되는 속도

의 측정을 위해서 24 well culture plates내의 세포배양액을 제거하고 세포층을 5% TCA를 1ml넣고 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 방치하였다. 그 후 5% TCA로 2회 세척하고 찬 ethanol 1ml를 넣어 씻은 후 실온에서 건조 시켰다. 이상의 과정을 통해 DNA내로 편입하지 않은 방사능을 씻어 내고, 준비된 세포층에 500 μ l의 2% Na₂CO₃가 포함된 0.1N NaOH를 넣어 세포를 완전히 녹인 후 scintillation cocktail 5ml와 섞었다. 그 후 DNA로 편입된 방사능을 β -counter로 5분간 측정하였고, 그 값은 CPM(counter per minute)으로 표기하였다.

III. 성 적

1) 치은섬유아세포의 증식능에 미치는 변형 성장인자- β 1의 영향

변형성장인자- β 1의 적용에 따른 치은섬유아세포의 증식능은 24시간 처리시에 대조군의 2.3 \pm 0.3 CPM \times 10³/well에 비하여 0.25ng/ml에서는 3.7 \pm 0.6 CPM \times 10³/well, 0.5ng/ml에서는 5.3 \pm 0.4 CPM \times 10³/well, 1ng/ml에서는 8.3 \pm 0.9 CPM \times 10³/well, 2.5ng/ml에서는 18.8 \pm 7.0 CPM \times 10³/well, 5ng/ml에서는 20.4 \pm 4.3 CPM \times 10³/well로 농도의존적으로 증가하였다. 통계적 유의성 검정결과 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 증가를 보였다(P<0.05). 치은섬유아세포에 48시간 변형성장인자- β 1을 투여한 군에서는 대조군의 33.7 \pm 6.1 CPM \times 10³/well에 비하여 0.25ng/ml에서는 44.0 \pm 8.5 CPM \times 10³/well, 0.5ng/ml에서는 42.3 \pm 7.0 CPM \times 10³/well, 1ng/ml에서는 80.1 \pm 2.1 CPM \times 10³/well, 2.5ng/ml에서는 131.3 \pm 13.2 CPM \times 10³/well, 5ng/ml에서는 151.1 \pm 19.0 CPM \times 10³/well로 0.5ng/ml에서 약간 감소하였으나 전반적으로 농도의존적으로 증가하였다. 대조군에 비해 1, 2.5, 5 ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다. 치은섬유아세포에 72시간 변형성장인자- β 1을 투여한 군에서는 대조군의 29.1 \pm 2.0 CPM \times 10³/well에 비하여 0.25ng/ml에서는 38.6 \pm 6.6 CPM \times 10³/well, 0.5ng/ml에서는 39.1 \pm

8.2 CPM $\times 10^3$ /well, 1ng/ml에서는 51.6 \pm 7.2 CPM $\times 10^3$ /well, 2.5ng/ml에서는 56.6 \pm 2.9 CPM $\times 10^3$ /well, 5ng/ml에서는 88.3 \pm 4.8 CPM $\times 10^3$ /well로 통계적 유의성은 없었으나 농도의존적으로 증가하였다. 48시간 적용시에 가장 높은 증식능을 보였으며 72시간 적용에서는 48시간 적용에 비해 전반적으로 증식능이 감소되는 경향을 나타내었다. (Fig. 1 참조)

2) 치주인대세포의 증식능에 미치는 변형성장인자- $\beta 1$ 의 영향

변형성장인자- $\beta 1$ 의 적용에 따른 치주인대세포의 증식능은 24시간 처리시에 대조군의 1.8 \pm 0.2 CPM $\times 10^3$ /well에 비하여 0.25ng/ml에서는 1.8 \pm 0.2 CPM $\times 10^3$ /well, 0.5ng/ml에서는 3.3 \pm 1.5 CPM $\times 10^3$ /well, 1ng/ml에서는 4.8 \pm 2.0 CPM $\times 10^3$ /well, 2.5ng/ml에서는 14.2 \pm 1.4 CPM $\times 10^3$ /well, 5ng/ml에서는 17.6 \pm 2.2 CPM $\times 10^3$ /well로 농도의존적으로 증가하였으며, 대조군에 비해 1, 2.5, 5ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다. 치주인대세포에 48시간 변형성장인자- $\beta 1$ 을

투여한 군에서는 대조군의 12.9 \pm 2.9 CPM $\times 10^3$ /well에 비하여 0.25ng/ml에서는 36.1 \pm 7.4 CPM $\times 10^3$ /well, 0.5ng/ml에서는 43.4 \pm 4.7 CPM $\times 10^3$ /well, 1ng/ml에서는 43.8 \pm 10.8 CPM $\times 10^3$ /well, 2.5ng/ml에서는 48.7 \pm 5.7 CPM $\times 10^3$ /well, 5ng/ml에서는 74.5 \pm 5.7 CPM $\times 10^3$ /well로 농도의존적으로 증가하였으며, 대조군에 비해 2.5, 5ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다. 치주인대세포에 72시간 변형성장인자- $\beta 1$ 을 투여한 군에서는 대조군의 21.6 \pm 1.1 CPM $\times 10^3$ /well에 비하여 0.25ng/ml에서는 30.1 \pm 1.6 CPM $\times 10^3$ /well, 0.5ng/ml에서는 34.6 \pm 2.6 CPM $\times 10^3$ /well, 1ng/ml에서는 44.8 \pm 5.9 CPM $\times 10^3$ /well, 2.5ng/ml에서는 51.8 \pm 8.5 CPM $\times 10^3$ /well, 5ng/ml에서는 46.2 \pm 5.5 CPM $\times 10^3$ /well로 5ng/ml의 농도에서 통계적 유의성은 없었으나 증식능이 감소하는 것으로 나타났다. 48시간 적용시에 가장 높은 증식능을 보였으며 72시간 적용에서는 48시간 적용에 비해 전반적으로 증식능이 감소되는 경향을 나타내었다. (Fig. 2 참조)

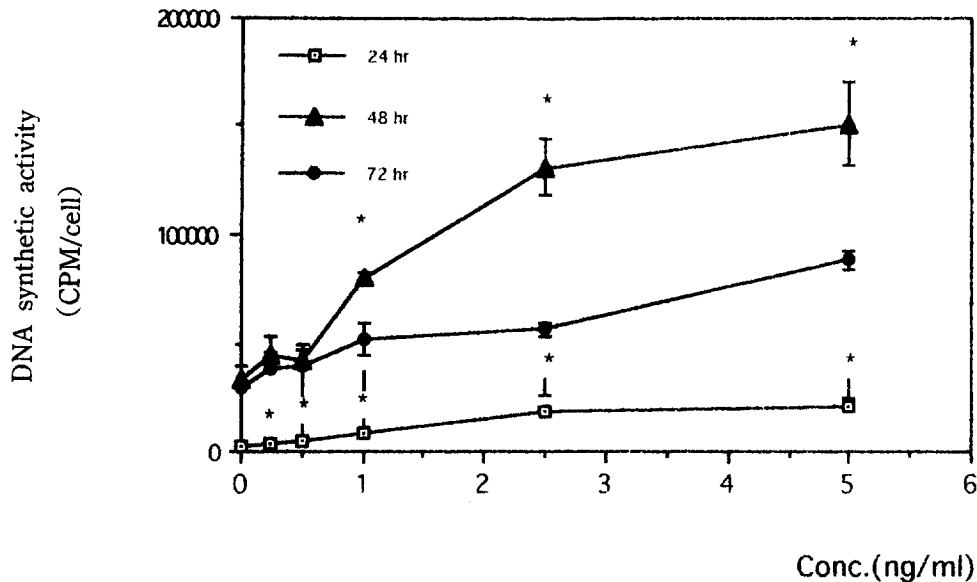


Fig. 1. Dose-dependent effect of TGF- $\beta 1$ on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts cultured for 24, 48 and 72hours in the presence of 1% bovine serum albumin. * significantly different from control value(P<0.05)

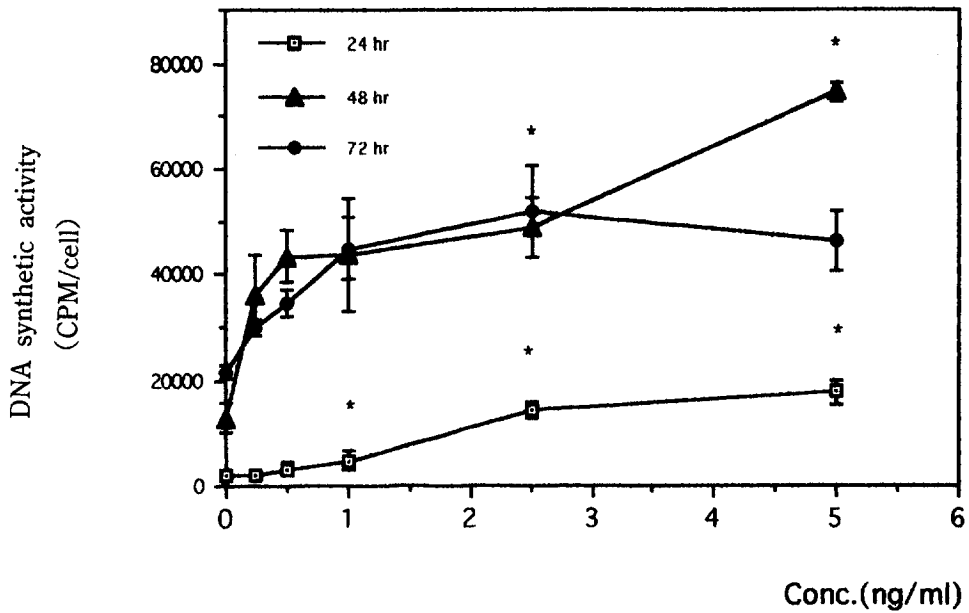


Fig. 2. Dose-dependent effect of TGF- β 1 on DNA synthetic activity in human periodontal ligament cells cultured for 24, 48 and 72hours in the presence of 1% bovine serum albumin.

* significantly different from control value($P < 0.05$)

3) 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식능에 대한 비교

변형성장인자- β 1의 적용에 따른 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식능은 모든 적용시

간과 농도별 비교에서 치은섬유아세포군이 치주인대세포군보다 더 높은 경향을 나타내었다. (Table 1, 2, 3)

Table 1. Dose-dependent effect of TGF- β 1 on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells cultured for 24hours in the presence of 1% bovine serum albumin.

Conc.(ng/ml)	DNA synthetic activity(CPM $\times 10^3$ /cell)	
	HGF(mean \pm S.D.)	PDL(mean \pm S.D.)
0	2.3 \pm 0.3	1.8 \pm 0.2
0.25	3.7 \pm 0.6*	1.8 \pm 0.2
0.5	5.3 \pm 0.4*	3.3 \pm 1.5
1	8.3 \pm 0.9*	4.8 \pm 2.0*
2.5	18.8 \pm 7.0*	14.2 \pm 1.4*
5	20.4 \pm 4.3*	17.6 \pm 2.2*

* significantly different from control value($P < 0.05$)

Table 2. Dose-dependent effect of TGF- β 1 on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells cultured for 72hours in the presence of 1% bovine serum albumin.

Conc.(ng/ml)	DNA synthetic activity(CPM $\times 10^3$ /cell)	
	HGF(mean \pm S.D.)	PDL(mean \pm S.D.)
0	33.7 \pm 6.1	12.9 \pm 2.9
0.25	44.0 \pm 8.5	36.1 \pm 7.4
0.5	42.3 \pm 7.0	43.4 \pm 4.7
1	80.0 \pm 2.1*	43.8 \pm 10.8
2.5	131.3 \pm 13.2*	48.7 \pm 5.7*
5	151.1 \pm 19.0*	74.5 \pm 1.7*

* significantly different from control value(P<0.05)

Table 3. Dose-dependent effect of TGF- β 1 on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells cultured for 72hours in the presence of 1% bovine serum albumin.

Conc.(ng/ml)	DNA synthetic activity(CPM $\times 10^3$ /cell)	
	HGF(mean \pm S.D.)	PDL(mean \pm S.D.)
0	29.1 \pm 2.01	21.6 \pm 1.1
0.25	38.6 \pm 6.6	30.1 \pm 1.6
0.5	39.1 \pm 8.2	34.6 \pm 2.6
1	51.6 \pm 7.2	44.8 \pm 5.9
2.5	56.6 \pm 2.9	51.8 \pm 8.5
5	88.3 \pm 4.8	46.2 \pm 5.5

* significantly different from control value(P<0.05)

IV. 고 찰

진행된 치주 질환에서 나타나는 치조골의 파괴와 부착상실을 저지하고 파괴된 치주조직의 재생을 위하여 여러 술식들이 시행되고 연구되어 왔다. 치주 치료의 최종 목표는 치주질환에 이환된 부위에 신생골, 신생백악질과 함께 새로운 치주인대 섬유가 기능적으로 삽입, 배열되어 재형성된 상태인 재생에 두고 있는데, 이에 관여하는 치주 조직은 치은, 치주 인대, 치근 백악질과 치조골로 되어 있다.^{1,2,3)}

치은섬유아세포는 치은결합조직내에 존재하는 세포의 약 65% 내지 85%를 차지하며 미분화중배엽세포로부터 분화되어 교원질과 elastin 등의 섬유와 비교원성 단백질, 당단백, 단

백당 등의 세포외기질을 분비하고 유지함으로써 치주조직의 치유에 관여하고 있으며,²⁻⁷⁾ 치주인대세포는 백악아세포, 골아세포, 섬유아세포, 파골세포와, 미분화된 중배엽세포들을 모두 함유하여 새로운 부착능력이 있는 치주인대세포들이 치근면을 따라 신부착을 형성하여 치주조직의 재생에 기여한다고 알려져 있다.^{1,2,3,4,8,9)}

이러한 치주조직의 재생에 관여하는 세포의 이주, 증식, 기질 합성등을 조절하는 인자중의 하나로 폴리펩타이드계 성장인자의 중요성이 대두되고 있으며¹⁷⁾ 미분화중배엽세포의 분화에 관여하는 폴리펩타이드계 성장인자¹⁸⁾ 중 변형 성장인자- β 1은 골세포와 섬유아세포의 증식, 기질 합성등을 촉진시킴으로써 골조직과 결합

조직의 대사에 관여하고 있다고 알려져 있으나,²⁸⁻⁴⁹⁾ 지금까지 치주조직의 재생에 대한 영향은 잘 규명되어 있지 않고 있어 본 연구에서는 변형성장인자-β1의 적용이 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식능에 미치는 영향을 알아 보고자 다양한 적용농도와 각각의 농도와 적용시간에 따른 두 세포간의 증식능을 상호 비교해 보고자 하였다.

변형성장인자는 Robert등에 의해 쥐의 normal rat kidney (NRK)섬유아세포에서 형질전환을 일으키는 원인인자로 발견되어진 이래로 그의 역할에 대해서는 많은 연구가 이루어져 왔다.²⁰⁻²⁷⁾ 변형성장인자는 사람의 전이성 흑색암종 (metastatic melanoma line A2058)에서 neoplasia를 유도하는 인자로서 상피성장인자에는 없는 threonine, phenylalanine을 함유하고 있는 변형성장인자라고 명명되어졌으며, 변형성장인자에는 α와 β가 있는것으로 밝혀져 있는데,²³⁾ 같은 변형성장인자라는 용어에도 불구하고, α와 β는 서로 상당히 다르다. 변형성장인자-α는 single chain 이며 분자량이 작고 상피성장인자 수용체에 경쟁적으로 결합한다고 알려져 있다.^{24,25)} 변형성장인자-β에 관한 초기의 연구는 국소적으로 세포의 수용체에 특이적으로 반응하여 세포의형질전환을 일으키는 인자로서의 기능에 대하여 주로 이루어졌다.²⁶⁾ Ignatz등⁴⁷⁾, Fine등⁴⁸⁾이 변형성장인자-β는 결합조직의 형성에 관여한다고 보고하였고, 최근에는 변형성장인자-β의 세포분화능력에 대해 조직재생에 관련한 연구가 많이 시행되어져 오고 있다.

본 연구에서 변형성장인자-β1의 적용농도에 따른 치주인대세포와 치은섬유아세포증식능은 두 세포군 모두에서 각 대조군에 비하여 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. Matsuda등⁵⁰⁾은 배양된 쥐의 치주인대세포에 변형성장인자-β를 투여하여 실험하였을 때 변형성장인자-β 0.01, 0.1, 1ng/ml 투여시 1ng/ml의 농도에서 증식능을 억제한다고 보고하였고, Oates등⁵¹⁾은 사람의 치주인대세포에 변형성장인자-β를 각각 0.01, 0.1, 1, 10, 20ng/ml 투여시 1ng/ml에서 유의성 있는 증가를 보였고,

10ng/ml에서 다소 감소하다가 20ng/ml의 농도에서 다시 증식능이 증가한다고 하였다. 본 실험에서 나타난 변형성장인자-β1, 5ng/ml을 72시간 적용시 증식능의 감소양상은 10ng/ml에서 다소 감소양상을 나타낸 Oates등⁵¹⁾의 보고와 함께 변형성장인자-β1의 적정 농도의 결정시 유의해 볼 필요가 있다고 사료되어 진다. 또한 본 연구의 결과는 Robey등³⁰⁾의 변형성장인자-β를 배양된 태생기 소의 골세포에 투여시 조골세포의 합성을 촉진한다는 보고와, Noda등³⁴⁾의 쥐의 두개관에 1μg의 변형성장인자-β를 투여하여 형성된 골의 두께를 측정하여 본 결과 투여된 변형성장인자-β에 대해 농도 의존적으로 골의 형성이 증가한다는 보고로 미루어 보아 변형성장인자-β의 골조직에 대한 반응과 유사하게 나타난것으로 여겨진다.

변형성장인자-β1의 적용시간에 따른 치주인대세포와 치은섬유아세포증식능의 결과는 48시간대에서 가장 높은 증식능을 나타내었고, 72시간대에서는 48시간대에 비해 전반적으로 증식능이 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 Oates등⁵¹⁾의 사람의 치주인대세포에 1ng/ml과 10ng/ml의 변형성장인자-β를 투여하고 48시간까지 배양하였을때 32시간대에서 DNA합성능력이 다소 증가하는 양상과 전반적으로 24시간 배양보다 48시간 배양에서 세포 증식능이 더 높게 나타난 결과와 유사하였으나, 사람의 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두에서 72시간 적용시에 48시간 적용에 비해 전반적으로 증식능이 증가하는것으로 나타난 Dennison등⁵²⁾의 보고와는 상당히 다른 결과를 나타내었다. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 각 적용별 농도와 시간에서 증식능을 비교하였을때 본 실험에서는 모든 경우에서 치은섬유아세포의 증식능이 더 높은 경향을 보였는데 반해 Dennison등⁵²⁾의 보고에서는 48, 72시간대에서 치주인대세포의 증식능이 치은섬유아세포보다 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과의 상이성은 실험방법과 변형성장인자-β1의 선택농도 차이에 원인이 있다고 사료되어진다. 본 실험에서는 3일간 세포배양 후 1% BSA로 교체하여 이틀간 세포주기를 정지시킨 후에 변형성장인자-β1을

적용함으로써, 10ng/ml 농도의 변형성장인자-β1을 투여하고 10%의 FBS를 배양액으로 한 Dennison등⁵²⁾의 실험보다는 고농도의 FBS 자체에 포함되어 있을 수 있는 다른 성장인자의 효과를 배제할 수 있음으로써 좀더 변형성장인자-β1 단독의 효과를 나타내었다고 사료되어진다.

그러나, 실험상에서 thrombin의 영향으로 혈소판에서 변형성장인자-β1이 분비될 때 잠복성의 220-235KD 복합체로 분비되어 주위의 조건, 즉 산성화³¹⁾나 염기성화 그리고 주성인자의 활동에 의해 활성화 된다는 보고⁵³⁾를 고려할때 다음의 연구에서는 주위환경에 대한 설정도 필요하리라 사료되며 변형성장인자-β1이 형질전환을 일으킨다는 초기의 연구²¹⁾와 Wahl등³⁴⁾의 변형성장인자-β가 자체에 의한 염증반응이나 기형적인 상피세포의 증식이나 감소를 나타내는데, 이는 단핵세포에서 cytokine을 분비하게 함으로써 나타난다는 보고등을 고려해볼 때 변형성장인자-β1에 대한 다른 성장인자와의 병용, 적용환경에 대한 설정에 관한 더욱 많은 연구와 다양한 각도의 분석이 뒤따라야 할 것이다. 따라서 사람에게 있어서의 치주조직에의 재생에 필요한 이용술식으로서는 조심스러운 접근이 필요하리라 사료되어지는 바이다.

V. 요 약

미분화중배엽세포의 분화에 관여한다고 알려진 변형성장인자-β1이 초기배양한 치주인대세포와 치은섬유아세포에 각기 다른 농도와 시간에 따라 변형성장인자-β1을 주입했을때 두 세포의 세포증식능에 미치는 영향을 알아보고 각 조건에 따른 두 세포간의 증식능을 상호 비교해 보고자 본 실험을 실시하였다.

교정치료를 목적으로 내원한 환자의 제 1 소구치 부위의 정상치은을 절제하고, 건강한 제 1 소구치를 발거하여 치은섬유아세포와 치주인대세포를 분리, 배양하여 변형성장인자-β1을 주입시키지 않은 군을 대조군으로 하고, 변형성장인자-β1을 각각 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5

ng/ml로 주입시킨 군을 실험군으로하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였으며, 각 시간별 배양 24시간 전에 1μCi/ml [³H]-thymidine을 첨가하여 [³H]-thymidine이 DNA내로 편재되는 속도로써 두세포군의 증식능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

DNA합성능에 미치는 변형성장인자-β1의 효과는 치주인대세포와 치은섬유아세포 모두에서 투여한 변형성장인자에 대하여 농도의존적으로 세포가 증식 하는 것으로 나타났다. 치은섬유아세포에 변형성장인자-β1을 투여한 군에서는 24, 48, 72시간 모두에서 각 대조군에 비하여 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 24시간 적용시 대조군에 비해 1, 2.5, 5 ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었고, 48시간 적용시에는 대조군에 비해 1, 2.5, 5 ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다. 48시간 적용시에 가장 높은 증식능을 보였으며 72시간 적용시에는 48시간 적용에 비해 전반적으로 증식능이 감소하는 경향을 보였다.

치주인대세포의 DNA 합성능에 미치는 변형성장인자-β의 효과는, 변형성장인자-β를 각각 24시간, 48시간 적용하였을때 각 대조군에 비하여 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 24시간 적용시에 대조군에 비해 1, 2.5, 5ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었고, 48시간 적용시에 대조군에 비해 2.5, 5ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다. 72시간 적용시에는 5ng/ml의 농도에서 증식능이 감소하는 경향을 보였다. 48시간 적용시에 역시 가장 높은 증식능을 보였으며 72시간 적용에서는 48시간 적용에 비해 전반적으로 증식능이 감소되는 경향을 나타내었다.

변형성장인자-β1의 적용에 따른 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식능은 모든 적용시간과 농도별 비교에서 치은섬유아세포군이 치주인대세포군보다 더 높은것으로 나타났다.

참고 문헌

1. 박준봉, 서조영외 : 치주과학, 지영문화사 (1992) P. 28-57.
2. Carranza, F. A. : Glickmans Clinical periodontology, 7nd edition, Philadelphia USA (1990) P. 28, 41.
3. Nyman, S., Lindhe, J. and Karring, T. : Textbook of Clinical Periodontology, 2nd edition, Munksguard Copenhagen (1989)
4. Karring, T., Nyman, S., Lindhe, J. and Sirirat, M. : Potentials for root resorption during periodontal wound healing, J. Clin. Periodontol., 11 : 41~52, 1984.
5. Bhaskar, S. N. : Orbans Oral histology and embryology, 10th edition, St.Louis USA (1986)
6. Wheater, P. R., Burkitt, H. G. and Daniels, V. G. : Functional Histology, 5th edition, Edinburgh England (1982)
7. Mariotti, A. and Cochran, D. L. : Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva, J. Periodontol., 61 : 103-111, 1990.
8. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대세포와 치은섬유아세포 의 성장에 관한 비교, 대한구강생물학회지, 15 : 14-28, 1991.
9. Melcher, A. H. : On the repair of potential of periodontal tissue, J. Periodontol., 47 : 256-60, 1976.
10. Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Platten, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue, J. Clin. Periodontol., 7 : 394~401, 1980.
11. Yukna, R. A. : Synthetic bone grafts in periodontics, Periodontol. 2000., 1 : 92-99, 1993.
12. Brunsvold, M. A. and Mellonig, J. T. : Bone grafts and periodontal regeneration, Periodontol. 2000., 1 : 80-91, 1993.
13. Renvert, S. and Egelberg, J. : Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid conditioning of the root surface, J. Clin. Periodontol., 8 : 459~473, 1981.
14. Nilveus, R. and Egelberg, J. : The effect of topical citric acid application of the healing of experimental furcation defects in dogs. III. The relative importance of coagulum support, flap design and systemic antibiotics, J. Periodont. Res., 15 : 551~560, 1980.
15. Greenstein, G. and Caton, J. G. : Biodegradable barriers and guided tissue regeneration, Periodontol. 2000., 1 : 36-45, 1993.
16. Karring, T., Nyman, S., Gottlow, J. and Laurell, L. : Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies, Periodontol. 2000., 1 : 26-35, 1993.
17. Terranova, V. P. and Wikesjo, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium, J. Periodontol., 58 : 371~380, 1987.
18. Graves, D. T. and Cochran, D. L. : Mesenchymal cell growth factors, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1 : 17~36, 1990.
19. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. : Molecular biology of the cell 3rd edition, New York USA (1994)
20. Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M. and Sporn, M. B. : Transforming growth factor- β in human platelets, J. Biol. Chem., 258 : 7155-7160, 1983.
21. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L. M., Roche, N. S., Stern, D. F. and Sporn, M. B. : Type B transforming growth fac-

- tor : A bifunctional regulator of cellular growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82 : 119–123, 1985.
22. Sharpe, P.M., Forman, D. M., Carette, M. J. M., Schor, S. L. and Ferguson, M. W. J. : The effects of transforming growth factor- β 1 on protein production by mouse embryonic palate mesenchymal cells in the presence or absence of serum, *Archs oral Biol.*, 37 : 39–48 , 1992.
 23. McCulloch, P. S. and Narayanab, S. A. : Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing, *J. Periodont. Res.*, 29 : 81–94, 1994.
 24. Sporn, M. B., Roberts, A. B., wakefield, L. M. and Assoian, R. K. : Transforming growth factor-B : Biological fx and chemical structure, *Science(Washington D.C)*, 233 : 532–534, 1986.
 25. Dixon, M. J. and Ferguson, M. W. J. : The effects of epidermal growth factor, transforming growth factors alpha and beta and platelet-derived growth factors on murine palatal shelves in organ culture , *Archs oral Biol.*, 37 : 395–410, 1992.
 26. Han, E. K., Guadagno, T. M., Dalton, S. L. and Assoian, R. K. : A cell cycle and mutational analysis of anchorage-independent growth : cell adhesion and TGF- β 1 control G1/S transit specifically, *J. Cell Biol.*, 122 : 461–471, 1993.
 27. Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R. K., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Goeddel, D. V. : Human transforming growth factor-B complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells, *Nature* , 316 : 701–705, 1985.
 28. Pfelschifter, J., Souza, S. M. D. and Mundy, G. R. : Effects of transforming growth factor- β on osteoblastic osteosarcoma cells, *Endocrinol.*, 121 : 212–218, 1987.
 29. Pfeilschifter, J. Seyedin, S. M. and Mundy, G. R. : Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures, *J. Clin. Invest.*, 82 : 680–685, 1988.
 30. Pfeilschifter, J., Wolf, O., Naumann, A., Minne, H. W. Mundy, G. R. and Ziegler, R. : Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor, *J. Bone and mineral res.*, 5 : 825–830, 1990.
 31. Pfeilschifter, J., Bonewald, L. and Mundy, G. R. : Characterization of the latent transforming growth factor β complex in bone, *J. Bone and mineral res.*, 5 : 49–58, 1990.
 32. Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R. G. K., Minne, H. W. and Ziegler, R. : Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors : a comparison between insulin-like growth factor 1, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor β , *Endocrinol.*, 127 : 69–75, 1990.
 33. Robey, P. G., Young, M. F., Fladers, K. C., Roche, N., Kondaiah, P., Reddi, A. H., Termine, J. D., Sporn, M. B. and Roberts, A. B. : Osteoblast synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro, *J. Cell Biol.*, 105 : 457–463, 1987.
 34. Noda, M. and Camilliere, J. J. : In vitro stimulation of bone formation by transforming growth factor- β , *Endocrinol.*, 124 : 2991–2994, 1989.
 35. Mundy, G. R. and Bonewald, L. F. : Role of TGF- β in bone remodeling, *Ann. N.Y. Aca.Sci* ,593 : 91–97, 1990.
 36. Marcelli, C., Yates, A. J. and Mundy, G. R. : In vivo effects of human recombinant transforming growth factor β on bone turnover in normal mice, *J. Bone and Mineral research*, 5 : 1087–1096 , 1990.

37. Bonewald, L. F. and Mundy, G. R. : Role of transforming growth factor- β in bone remodeling, *Clinic. Orthopedics & related res.*, 250 : 261–276, 1990.
38. Strong, D. D., Beachler, A. L., Wergedal, J. and Linkhart, T. A. : Insulinlike growth factor II and transforming growth factor β regulate collagen expression in human osteoblastlike cells in vitro, *J. Bone and mineral res.*, 6 : 15–23, 1991.
39. Rosen, D., Miller, S. C., DeLeon, E., Thompson, A. Y., Bentz, H., Mathews, M. and Adams, S. : Systemic administration of recombinant transforming growth factor beta 2 stimulates parameters of cancellous bone formation in juvenile and adult rats, *Bone* , 15 : 355–359,1994.
40. Oreffo, R. O. C., Bonewald, L., Kukita, A., Garrett, I. R., Seyedin, S. M., Rosen, D. and Mundy, G. R. : Inhibitory effects of the bone-derived growth factors osteoinductive factors and transforming growth factor- β on isolated osteoclasts, *Endocrinol.*, 126 : 3069–3075,1990.
41. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : Growth factors and the regulation of bone remodeling, *J. Clin. Invest.*, 81 : 277–281, 1988.
42. Chenu, C., Pfeilschifter, J., Mundy, G. R. and Roodman, G. D. : Transforming growth factor β inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures, *Proc. Natl. Acad.Sci.*, 85 : 5683–5687, 1988.
43. Chenu, C., Kurihara, N., Mundy, G. R. and Roodman, G. D. : Prostaglandin E2 inhibits formation of osteoclastlike cells in long-term human marrow cultures but is not a mediator of the inhibitory effects of transforming growth factor β , *J of Bone and mineral research*, 5 : 677–681 , 1990.
44. Fine, A. and Goldstein, R. H. : The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, 262 : 3897–3902, 1987.
45. Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J. : Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β 1 and concanavalin A : Regulation of matrix metalloproteinases and TIMP, *J. Periodont. Res.*, 26 : 279–282, 1991.
46. Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J. : Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase / type IV collagenase by transforming growth factor- β 1 in human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, 266 : 14064–14071,1991.
47. Ignatz, R. A. and Massague, J. : Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix, *J. Biol. Chem.*, 261 : 4337–4345, 1986.
48. Salo, T., Lyons, J. G., Rahemtulla, F., Birkedal-Hansen, H. and Larjava, H. : Transforming growth factor - β 1 up regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes, *J. Biol. Chem.*, 266 : 11436–11441, 1991.
49. Ishikawa, O., Leroy, E. C. and Trojanowska, M. : Mitogenic effects of transforming growth factor β 1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-derived growth factor receptors, *J. Cellular Physiol.*, 145 : 181–186, 1990.
50. Matsuda, N., Lin, W-L., Kumar, N. M., Cho, M. I. and Genco, R. J. : Mitogenic, chemotactic and synthetic response of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, *J. Periodontol.*, 63 : 515–525, 1992.
51. Oates, T. W., Rouse, C. A. and Cochran, D. : Transforming growth factor- β 1 stimulates proliferation and collagen synthesis in rat periodontal ligament fibroblasts, *J. Periodontol.*, 63 : 526–531, 1992.

- D. L. : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro, *J. Periodontol.*, 64 : 142–148 , 1993.
52. Dennison, D. K., Vallone, D. R., Pinero, G. J., Rittman, B. and Caffesse, R. G. : Differential effects of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts, *J. Periodontol.*, 65 : 641–648, 1994.
53. Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C. and Sporn, M. B. : Latent transforming growth factor- β from human platelets, *J. Biol. Chem.*, 263 : 7646–7654. 19
- 88.
54. Wahl, S. M., Costa, G. L., Mizel, D. E., Allen, J. B., Skaleric, U. and Mangan, D. F. : Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation, *J. Periodontol.*, 64 : 450–455, 1993.
55. Irwin, C. R., Schor S. L. and Ferguson M. W. J. : Effects of cytokines on gingival fibroblasts in vitro are modulated by the extracellular matrix, *J. Periodont. Res.*, 24 : 309–317, 1994.

THE EFFECT OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β_1 ON THE PROLIFERATION RATE OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS AND HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS.

Eun-Kyung Cho, Jae-Mok Lee, Jo-Young Suh

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University

The use of transforming growth factor- β_1 which functions as a potent biologic mediator regulating numerous activities of wound healing has been suggested for the promotion of periodontal regeneration. The mitogenic effects of transforming growth factor- β_1 on human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts were evaluated by determining the incorporation of [^3H]-thymidine into DNA of the cells dose-dependently. Cells were prepared with primary cultured fibroblasts and periodontal ligament cells from humans, and used in experiments were the fourth or sixth subpassage.

Cells were seeded with serum free Dulbecco's modified Eagle medium containing 0.1% bovine serum albumine. The added concentrations of transforming growth factor- β_1 were 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5ng/ml and transforming growth factor- β_1 were added to the quiescent cells for 24hours, 48hours, 72hours. They were labeled with 1nCi/ml [^3H] thymidine for the last 24hour of the each culture. The results were presented as the mean counts per minute (CPM) per well and S.D. of four determinations. The results were as follows. :

The DNA synthetic activity of human gingival fibroblasts was increased dose-dependently by transforming growth factor- β_1 at 24 hours, 48 hours and 72 hours. The maximum mitogenic effects were at the 48 hour application of transforming growth factor- β_1 . The DNA synthetic activity was generally more decreased at the 72 hour application than at the 48 hour the application of transforming growth factor- β_1 .

The DNA synthetic activity of human periodontal ligament cells was increased dose-dependently by transforming growth factor- β_1 at 24 hours and 48 hours. But the DNA synthetic activity was decreased at 5ng/ml of the 72 hour application. The maximum mitogenic effects were also at the 48 hour application of transforming growth factor- β_1 . The DNA synthetic activity of human periodontal ligament cells was generally more decreased at the 72 hour application than at the 48 hour application of transforming growth factor- β_1 .

In the comparision of DNA synthetic activity between the human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells, the human gingival fibroblasts had more activity than the human periodontal ligament cells at all time application with the concentration of transforming growth factor- β_1 .

In conclusion, transforming growth factor- β_1 has an important roles in the stimulation of DNA synthesis in human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts, which means an increase in collagen synthesizing cells and thus, may be useful for clinical application in periodontal regenerative procedures.