치주인대세포와 치은 섬유아세포의 혼합배양이 석회화 결절형성에 미치는 영향

인영미 · 박준봉 · 이만섭 · 권영혁

경희대학교 치과대학 치주과학교실

Ⅰ. 서 론

치주질환 치료의 궁극적인 목적은 소실된 연조직의 결합조직뿐만 아니라 백악질과 치조골의 재생을 유도하여 치주 부착조직을 증가시키는 것으로, 치주조직의 치유과정에 있어 치주인대에서 유래된 세포만이 이러한 부착조직의 재생을 가능하게 한다.[1-6] Nyman등(1982)[3]은 골결손 부위에 상피세포와 치은 결합조직에서 유래되는 세포의 침투를 막고 치주인대세포만의 증식을 허용하는 방법으로 차단막을 이용한 조직유도재생술을 적용하여 결합조직의 부착과 함께 신생 배악질의 형성을 관찰하였고, 그 이후 치주조직 재생술식에 있어서 괄목할만한 발전이 이루어져 왔다. 그러나 경조직인 백악질과 특히 치조골의 재생에 관여하는 세포의 기원과 분화및 석회화기전에 대해서는 아직 밝혀진 바가 적다.

Gould등(1977, 1980)[7,8]과 McCulloch(1985)[9]등은 치주 경조직재생에 관여하는 전구세포가 치주인대의 혈관 주위에 존재한다고 하였고, McCulloch와 Melcher(1983 a, b)[10,11] 그리고 Aukhil등(1986)[12]은 이들 전구세포가 치조골과 백악질 쪽으로 이동하면서 조골세포와 조백악세포로 분화한다고 하였다. 한편, McCulloch등(1987)[13]과 Melcher등(1986, 1987)[14,15]은 골내막강에서 기원하는 세포가 혈관을 통해 치주인대조직내로 이동하여 조골세포와 조백악세포로 분화한다고 주장하였다. 그러나 최근 Herr등(1995)[16]은 혈관 근접세포나 골내막세포는 치주조직의 재생에 크게 기여하지 않는다고 하였다.

조골세포와 유사한 치주인대세포의 특징으로 alkaline phosphatase(ALPase) 활성도가 높고, 전체 교원질의 95%이상이 제1형 교원질로 구성되며, 부갑상선 호르몬에 대한 반응으로 cyclic AMP가 증가하고 osteonectin과 biglycona과 같은 골단백질을 생합성한다는 점을 들 수 있다.[17] 그러나 조골세포의 marker가 아직 밝혀지지 않았고, ALPase를 비롯한 다른 요소들도 조골세포임을 증명하는 결정적인 특징이라고 할 수 없다. 현재로서는, 실험적인 실험에서 치주인대세포로부터 석회화 결절형성을 유도하는 것이 치주인대세포가 조백악세포와 조골세포로 분화하여 각각 백악질과 치조골의 재생에 관여한다는 결정적인 증거가 될 수 있다.

Arceo등(1991)[17]은 사람의 치주인대세포와 치은 섬유아세포를 ascorbic acid, β-glycerophosphate, dexamethasone이 첨가된 조건배지에서 배양하여 치주인대세포에서 무정형의 침착물 형성을 관찰하였고, 전자현미경상에서 교원질표면을 중심으로 치밀한 무정

형의 물질이 침착됨을 관찰하였으나 치은 섬유아세포에서는 이러한 상이 나타나지 않았다. 또한 dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주인대세포뿐만 아니라 조골세포도 결절이나 치밀한 물질을 형성시키지 못하였다.

Cho등(1992)[18]의 실험에서는 치주인대의 조섬 유세포가 조골세포나 골세포로 분화된 양상없이 고유의 형태를 유지하면서 석회화 결절을 형성함을 관찰하였으며, 조골세포와 연골세포가 각각 자신의 독특한 본래의 조직을 형성한다는 사실에서 미루어 볼 때, 고유의 형태적 특징을 보유하는 치주인대세포에서 형성된 석회화 결절은 무세포성 배악질인 것으로 추정된다고 하였다.

Mukai등(1993)[19]의 실험에서는 결절내에 조골세포나 골세포와 유사한 세포들 및 교원기질과 기질낭포(matrix vesicle)가 존재하며, 이 결절이 수산화인회석의 결정구조를 갖음을 관찰하고, 치주인대세포내에는 조골세포로 분화하여 골과 유사한 조직을 형성할 수 있는 골전구세포(osteoprogenitor cell)가 존재한다고 주장하였다.

그러나 Melcher등(1986)[14]의 치근절편과 두개골세포, 치주인대세포와 치은섬유아세포를 혼합배양한 실험적인 실험에서는 두개골새포의 경우에서만 골이나 백악질과 유사한 구조의 결절 형성이 일어나고, 치주인대세포와 치은 섬유아세포에서는 결절형성이 관찰되지 않았다.

이와같이 여러 실험실적 실험상에서 치주인대세포의 결절형성이 상이하게 나타나는 것은 치주인대세포내에 여러 이종성 세포군들이 존재하기 때문이며, 세포의 세대수와 배지의 조성등도 미칠 수 있다.[19]

생체조직내에는 치주인대세포만 단독으로 존재하는 것이 아니라 여러 종류의 세포가 함께 존재하고, 특히 치주조직의 치유과정에 있어서 치은결합조직으로부터 기원하는 치은 섬유아세포가 결손부내로 먼저 증식하여 들어감으로서 치주조직의 신부착 및 재생을 방해하게 된다. 치주인대세포와 치은 섬유아세포는 치주조직의 재생에 있어 밀접한 관계를 가지고 있기 때문에, 치주 조직의 재생과정을 이해하는 데 있어서 단위세포만의 반응을 관찰하기 보다 두 세포군 간의 상호작용을 살펴보는 것이 비교적 조직내 현상과 유사한 결과를 얻는데 도움이 되리라 생각한다.

본 연구에서는 실험실적 실험으로 치주인대세포의 석회화 결절형성 유도를 통하여 치주인대세포가 조골세포나 조백악세포로 분화하여 경조직재생에 관여함을 입증하고, 치주인대세포의 경조직 재생능이 치은 섬유아세포와 혼합 배양시 어떠한 변화를 갖는가를 관찰함으로서 치주 조직의 재생시의 세포상호간의 작용을 구명할 목적으로 본 실험을 시행하였다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 치주인대세포의 배양

교정치료를 목적으로 발거한 제1소구치를 200unit/ml penicillin(Gibco, U.S.A.)과 1㎍/ml streptomycin(Gibco, U.S.A.), 200㎍ /ml streptomycin(Gibco, U.S.A.)과 1㎍ /ml amphotericin-B(Gibco, U.S.A.)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, U.S.A.)로 구성된 생검배지로 4회 세척하였다. 치근 중앙 1/3에서 치주인대 조직을 blade로 채취하여 직경 35mm의 배양접시에 고르게 분포시킨 다음 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.)과 100unit/ml penicillin, 100㎍/ml streptomycin, 0.5㎍/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM으로 구성된 배양액을 넣고, 37°C, 100% 습도, 5% CO_2 공기혼합 배양기(Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다.

치주인대세포가 조직절편으로부터 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층이 형성되면 0.05% tripsin/0.02% EDTA를 처리하여 배양접시로부터 세포를 박리하고 1 : 3 계대배양 하여 5-7세대의 세포를 본 실험에 사용하였다.

2) 치은 섬유아세포의 배양

교정치료를 목적으로 내원한 환자로부터 제1소구치 발치시 건강한 치은조직을 채취하여 치주인대세포에서와 같은 조성의 생검배지로 4회 세척하였다. 조직편을 약 $1mm^3$의 크기로 세절하여 직경 35mm의 배양접시에 10-15조각 정도를 고르게 분포시키고 치주인대세포 배양에서와 같은 방법으로 배양하여 5-7세대의 세포를 사용하였다.

2. 연구방법

1) 실험군 설정

실험군으로는 치주인대세포 대 치은 섬유아세포의 혼합비율을 달리한 다섯 군을 설정하였다. 치주인대세포만을 배양하는 군을 1군으로 하고, 치주인대세포 70%와 치은 섬유아세포 30%로 혼합한 경우를 2군(P7 : G3), 치주인대세포 50%와 치은 섬유아세포 50%로 혼합한 경우를 3군(P5 : G5), 치주인대세포 30%와 치은 섬유아세포 70%로 혼합한 경우를 4군(P3 : G7), 치은 섬유아세포만을 배양한 경우를 5군으로 총세포수는 다섯 군이 모두 동일하게 하였다.

2) 세포 증식율 측정

24 well 배양접시에 다섯 군의 세포 1×10^4/well개를 10% FBS, 100unit/ml penicillin, 100㎍/ml streptomycin, 0.5㎍/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 100% 습도, 5% Co_2 공기혼합 배양기에서 배양하였다. 배양 1, 3, 7, 15, 21, 및 30일에 0.05% Trypsin으로 처리하여 증식된 세포를 박리한 다음 hemocytometer에 한 방울 흡수시켜 도립현미경하에서 세포수를 측정하였다.

3) Alkaline phosphatase 활성도 측정

다섯군의 세포를 35mm 배양접시에 4×10^4개씩 분주하고 50㎍ ascorbic acid, 10mM Na-β-glycerophosphate, 그리고 10^{-7} M dexamethasone, 10% FBS와, 100unit/ml penicillin, 100㎍/ml streotomycin, 0.5㎍/m amphotericin-B가 포함된 DMEM으로 구성된 조건배지에서 배양하였다. 배양 7일과 10일에 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 0.05% Trypsin으로 처리하여 세포를 배양접시에서 박리한 다음 1500rpm으로 6분간 원심분리하였다. 원침후 상층액을 제거하고 0.5ml 증류수를 첨가한 다음, sonic dismembrator(Fisher model 60, Fisher Scientific)로 초음파 분해하였다. 이를 다시 원심분리하여 상층액을 채취하고 알카리성인산분해효소 측정용 시약(Al.P.K.kit, 영동제약)과 반응시킨 다음 UV-VIS spectrophotometer (UV-VIS spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu)를 이용하여 450mm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 석회화 결절의 관찰

다섯군의 세포를 각각 35mm 배양접시에 4×10^4 개씩 분주하여 50㎍ ascorbic acid, 10 mM Na-β-glycerophosphate, 그리고 10^{-7} M dexamethasone, 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100㎍/ml streptomycin, 0.5㎍/m amphotericin-B가 포함된 DMEM으로 구성된 조건배지에서 3일 간격으로 배양액을 갈아주면서 14일간 배양하였다. 양성 대조군으로서, 혼합배양인 2, 3, 4군에서와 같은 수의 치주인대세포만을 위와 같은 조건으로 단독배양하였다. 즉, 재조군의 경우 총세포수가 실험군에 비하여 각각 70%, 50%, 30%로 감소한다.

석회화 결절의 형성을 관찰하기 위한 방법으로 칼슘과의 킬레이트반응을 이용하는

Alizarin red S 염색을 사용하였다. Dahl의 염색방법에 따라, 10% neutral formalin solution에 30분간 염색하고 다시 세척후 Light green SF yellow stain으로 수초간 대조염색하였다. 도립현미경하에서 관찰후, 1.5×1.5cm^{2}의 격자내의 염색된 결절수를 측정하여 비교하였다.

5) 통계분석

세포증식율, ALPase 활성도, 그리고 석회화 결절수에 있어서 실험군의 유의성을 평가하기 위해 일원분산분석법(one-way analysis of variance)과 F-검정을 실시하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. 세포증식율 측정

치주인대세포만으로 이루어진 1군, 치주인대세포 70%와 치은 섬유아세포 30%로 혼합한 2군, 치주인대세포 50%와 치은 섬유아세포 50%로 혼합한 3군, 치주인대세포 30%와 치은 섬유아세포 70%로 혼합한 4군, 치은 섬유아세포만을 배양한 5군을 1, 3, 7, 15, 21, 및 31일간 배양후 세포수를 측정하여 세포증식율을 비교하였다(Table 1, Fig. 1). 7일과 15일에서 각 군간의 세포수를 비교해 보면 1군이나 5군보다 혼합배양상태인 2, 3, 및 4군에서 세포증식율이 더 크고, 7일과 15일에서 모두 3군(6.35±0.87: 9.35±1.0)이 1군(4.20±0.93: 7.03±0.77)과 5군(5.18±1.01: 7.65±1.32)에 대하여 세포증식율이 유의성있게 증가하였다($P<0.05$).

2) Alkaline phosphatase activity 측정

다섯군의 세포를 배양 7일과 10일에 ALpase 활성도를 측정한 결과, 배양 10일에서 1군과 2군 사이를 제외하고는 치주인대세포의 비율이 감소함에 따라 효소의 활성도가 점차 감소하였다($P<0.05$). 배양 10일에서, 치주인대세포만으로 구성된 1군(1.57±0.11)이 치은 섬유아세포가 30% 혼합배양된 2군(1.67±0.08)보다 효소의 활성도가 낮게 나타났으나, 통계학적인 유의성은 없었다. 또한, 모든 실험군에서 7일에 비하여 10일에서 효소의 활성도가 증가한 것으로 나타났다(Table 2, Fig. 2).

3) 석회화 결절의 관찰

살펴보면, 약 7일경 치주인대세포만으로 이루어진 1군에서 제일 먼저 결절로 추정되는 것이 관찰되었고, 이후 결절수가 증가되고 2, 3, 및 4군에서도 결절형성이 나타났다. 14일경,

Table 1. Cell Proliferation on Co-Culture of Periodontal Ligament Cell and Gingival Fibroblast.

Group (Cell Mix Rotio)	Number of Cell (mean±SD)					
	1 Day	3 Days	7 Days	15 Days	21 Days	30 Days
1 (P10 : G0)	1.45±0.54	2.23±0.34	4.20±0.63	7.03±0.77	9.13±1.08	8.98±1.20
2 (P7 : G3)	1.15±0.38	2.30±0.68	4.93±0.74	8.43±1.31	9.25±0.83	7.08±1.21
3 (P5 : G5)	1.15±0.33	2.35±0.62	6.35±0.87	9.35±1.0	7.23±1.24	6.63±1.66
4 (P3 : G7)	1.45±0.47	2.05±0.28	6.15±0.59	7.80±0.98	6.70±1.03	4.33±1.21
5 (P0 : G10)	1.25±0.32	2.63±0.57	5.18±1.01	7.65±1.32	5.20±1.19	2.55±0.35

Number of initial inoculatied cell : 1×10^4 cells/ml

P : Periodontal ligament cell

G : Gingival fibroblast

석회화돈 결절형성을 관찰하고 각 군간의 결절수를 비교하기 위하여 Alizarin red S 염색을 실시하였다. 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있으며, 결절 중앙 부위가 진하게 농

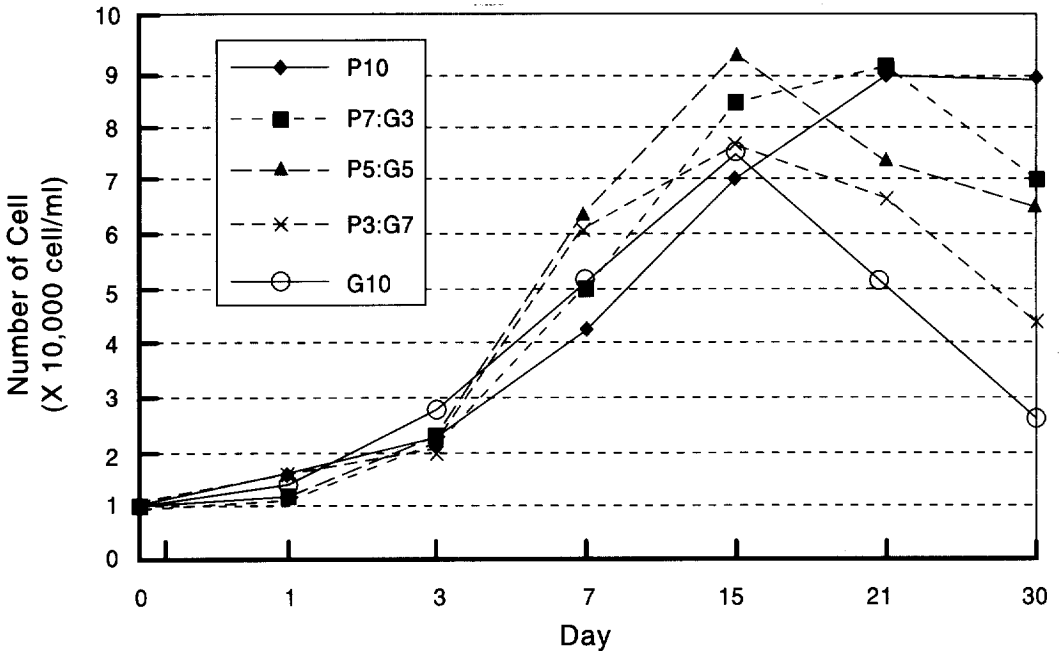

Fig. 1. Cell Proliferation on co-culture of periodontal ligament cell and gingival fibroblast.

Table 2. Alkaline phosphatase activity on coculture of periodontal ligament cell and gingival fibroblast.

Group (Cell Mix ratio)	ALP activity(IU)	
	7 Days	10 Days
1 (P 10)	0.94±0.02	1.57±0.11*
2 (P7 : G3)	0.74±0.02	1.67±0.08**
3 (P5 : G3)	0.53±0.02	1.39±0.09**
4 (P3 : G7)	0.38±0.01	0.82±0.07**
5 (G 10)	0.31±0.00	0.38±0.01*

Values are mean ± SD

*: Statistically significant difference from ALPase activity in 7 days

* P<0.01, **P<0.01

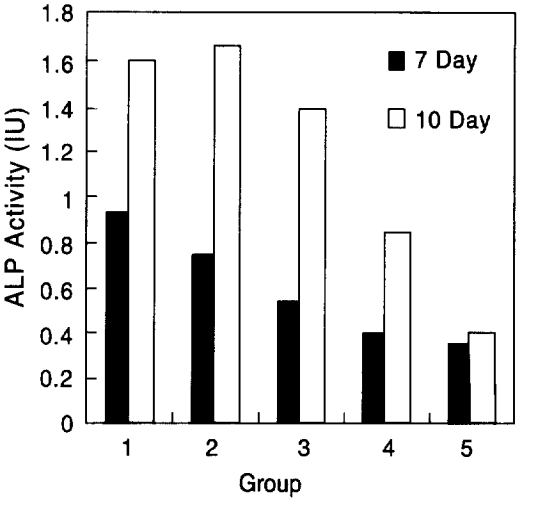

Fig. 2. Alkaline phosphatase activity on coculture of periodontal ligament cell and gingivalfibroblast.

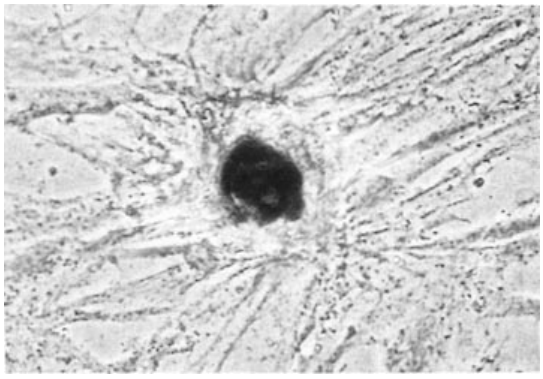

Fig. 3. Calcified nodule formation of periodontal ligament cell on day 14 of culture in phase contrast inverted microscope (Alizarin red S stained view × 200)

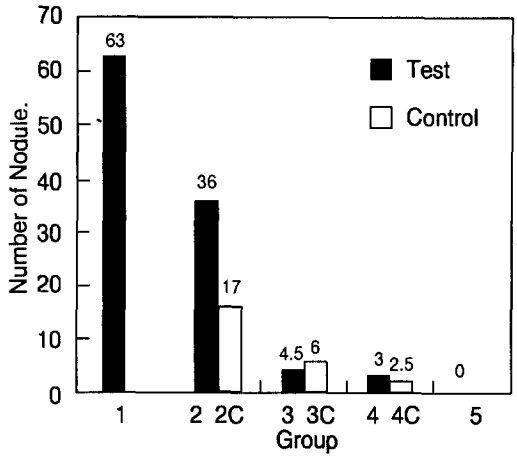

Fig. 4. Number of calcified nodule on co-Culture of periodontal ligament cell andgingival fibroblast.
C : (Control group) Onyl periodontal ligament cell culture
* : Statistically significant difference from co-cultre of Periodontal ligament cell and gingival fibroblast(P<0.05)

염되고 주위로 연하게 염색되는 양상을 보였다(Fig. 3).

1.5×1.5cm²의 장방형의 격자내에 형성된 각 군의 결절수를 비교한 결과, 1군에서 가장 많은 결절형성을 보였고, 치주인대세포의 혼합비율이 낮아질수록 결절수는 급격히 감소하였다. 이를 통계분석한 결과, 1군, 2군 그리고 3군 사이에는 결절수에 상당한 유의성있는 차이를 보였고(P<0.01), 3군, 4군 그리고 5군 사이에는 통계학적 유의성이 없었다. 또한 치주인대세포대 치은 섬유아세포의 비율이 7 : 3인 2군과 치주인대세포만을 2군과 같은 수로 배양한 경우인 대조군 2C군 사이에 결절형성의 차이를 보이나(P<0.05), 3군과 3C군 그리고 4군과 4C군 사이에는 차이가 없었다(Fig. 4).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

치주인대세포와 치은 섬유아세포를 혼합배양하여 세포상호간의 복합작용을 관찰한 결과, 세포증식율은 치주인대세포로만 구성된 1군이나 치은 섬유아세포만으로 구성된 2군보다 혼합 배양한 2, 3, 및 4군에서 세포증식이 더 크고 특히 치주인대세포와 치은 섬유아세포가 동일 비율로 혼합된 3군에서 세포증식율이 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 치주인대세포와 치은 섬유아세포의 혼합배양이 세포증식에 있어서 억제적으로 작용하는 것이 아니라 오히려 상승작용을 하여 치은 섬유아세포의 증식이 촉진된 것으로 추정된다.

치주인대세포의 혼합비율이 감소함을 따라 ALPase 활성도도 비례적으로 감소하였고 이러한 결과로 미루어보아 ALPase 활성도는 치은 섬유아세포의 영향없이 치주인대세포 절대양의 차이에 의해서 영향을 받는 것으로 생각되며, 결절이 형성되기 시작하면서 이 효소가 감소하는 것으로 보아 ALPase는 결절형성 초기에 주로 관여하는 것으로 짐작된다. 또한, 배양 10일에서 ALPase 활성도가 1군과 2군 사이에 차이가 없는 것은 결절형성에 따른 세포수의 감소와 관련된 것으로 사료된다.

각 군의 결절수를 비교한 결과, 치주인대세

포의 혼합 비율이 낮아질수록 결절수는 급격히 감소하여, 혼합배양인 3, 4군과 치은 섬유아세포 단독배양인 5군 사이에 결절수의 차이가 없었으며, 치주인대세포 대 치은 섬유아세포의 비율이 7 : 3인 2군에서 치주인대세포만을 2군과 같은 수로 하는 대조군보다 결절형성이 현저히 많았다. 이로서 결절형성은 치주인대세포에서 이루어지며 치은 섬유아세포는 치중인대세포의 결절형성 기전을 억제하는 것으로 보이며, 배양용기내 총세 포수도 결절형성에 영향을 미치는 것으로 추정된다.

치주인대세포는 이종성을 가지고 있으며, 여기에는 조골양세포군, 조배악세포군, 조섬유세포군이 존재한다. 이 세포들이 각각의 모세포를 따로 가지는지 아니면 하나의 모세포에서 분화되는 것인지는 아직 밝혀지지 않았으나, 치주인대의 조백악세포와 조골세포의 모세포는 치주인대와 치조골의 골내막강에서 함께 기원한다고 생각되고 있다.[20, 21] 또한 치근 절편에서 배양되는 조골세포가 백악질 구조를 갖는 물질을 형성하고 골내막강이 개통되는 부위의 치근에서 백악질형성이 증가되는 양상 등으로 보아 조백악세포는 조골세포와 그 기원을 같이하는 것으로 생각되며, 조백악세포는 조골세포의 분화된 형질이 아닌가 추측된다.[13]

치주인대세포는 실험실적 실험에서 높은 ALPase 활성도를 보이고[17, 22], 골조직 특징 중의 하나인 제1형 교원질의 높은 생성을 보인다. 또한, 부갑상선 호르몬에 대한 반응으로 cyclic AMP가 증식하고, osteonectin, biglycon, bonegla protein과 같은 골관련 단백질을 생합성하는[23] 등의 조골세포와 유사한 성질을 보인다.

그러나 치은 섬유아세포는 치주인대세포에 비하여 ALPase 활성도에 낮고[17, 22], 치주인대세포는 배지의 조건에 따라 석회화 결절을 형성하지 않는다.[17]

ascorbic acid와 β-glycerophosphate는 세포배양시 골성기질의 형성과 석회화에 필수적인 요소이다.[24-26] ascorbic acid는 전교원질분자(procollagen molecule)의 proline기를 수산화(Hydoxylation)시켜 삼중헬릭스구조(triple helix structure)를 안정화시키는 역할을 하여 세포배양시 골성기질 형성에 필수요소로 작용하고, β-glycerophosphate는 ALPase의해 가수분해되어 석회화에 필요한 인산이온을 공급하는 역할을 한다.[27] Tenenbaum과 Palango(1987)[28]는 ALPase는 석회화의 개시에 있어서 인사염 이온의 유기원으로 주로 β-glycerophosphate를 이용하며, 실험실적 실험에서 충분한 무기인산염의 농도하에서도 석회화가 이루어지지 않는 것은 유기인산염의 농도가 생체실험에서의 10 mM보다 낮은 농도인 4 mM정도이기 때문으로 석회화개시에 있어서 인산염의 공급원으로서 유기인산염이 무기인산염보다 더 중요하다고 하였다.

dexamethasone은 실험실적 실험에서 적절한 농도로 배양액에 첨가시켰을 때 조골세포를 분화시켜 골형성을 증가시킨다고 하며[26, 29, 30], 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamethasone으로 처리한 경우 골특이성의 표지 단백질인 osteopontin, ALPase 그리고 osteocalcin의 합성이 증가하였다.[31-33] 한편, dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주인대세포뿐만아니라 조골세포도 결절이나 그와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못하였다.[17]

그밖에 실험실적 실험상의 석회화 결절형성에 영향을 미치는 요소들로는 세포밀집도, 혈청, 세포공급원의 연령과 각종 성장인자들을 포함하는 cytokines 등이 있다.[34]

ALPase는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서 세포외기질에 calcium phosphate를 참착시킴으로서 석회화를 유도하는 기능을 갖는다.[35-37] De Bernard(1982)[38]는 ALPase가 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백로 전환시키고 이것

이 칼슘결합 성향을 갖음으로서 인단백질이 석회화의 핵으로서의 역할을 한다고 하였다.

골관련 단백질에 대한 광범위한 연구[39-41]에도 불구하고, 골형성기전에 있어서 이들의 정확한 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다. 그러나, 이들 단백질들은 칼슘염과 인산염에 결합하는 성질을 가지며 수산화인회석에 대한 친화성이 높은 특징을 보이기 때문에, 수산화인회석 결정체 형성의 핵으로 작용하고 핵의 성장과 용해와 같은 조절과정에도 관여할 것으로 생각된다.[42]

Rao등(1978)[43]에 의한 보고에서, 돼지의 치주인대세포는 PFE1에 대한 반응으로 cAMP가 증가하나 부갑상선 호르몬과 칼시토닌에 대한 반응은 나타나지 않았다. 1990년 Sommerman 등[23]은 사람의 치주인대세포가 osteonectin과 biglycna을 생합성하나, 부갑상선 호르몬이나 칼시토닌에 대한 cAMP가 증가한 반면, 치은조직이나 세포는 ALPase 활성도와 부갑상선 호르몬에 대한 cAMP의 증가가 보이지 않았다. 또한 치주인대 세포는 조골세포의 주요한 특징인자인 bone-gla protein(BGP)을 합성하였고, 10^{-8} M la, 25-dihydroxyvitamin D_3 [la, $25(OH)_2D_3$]첨가시 치주인대세포의 BGP 합성이 2-3배 증가하였다.

그러나 ALPase 활성도, 부갑상선 호르몬에 대한 반응 또는 교원질과골관련 단백질의 합성이 조골세포에서만 나타나는 특징적인 성질이라고 볼 수 없기 때문에, 현재로서는 석회화 결절의 형성이 치주인대세포가 조골세포와 유사함을 보이는 가장 결정적인 증거가 될 수 있다[45]. Ramakrishnan등(1995)[46]은 석회화 결절형성과정을 네단계로 구분하여, 배양요기내 세포밀도가 치밀한 단층을 이룬 다음, 계속적인 세포의 분열로 세포가 중층을 이루는 부위가 나타나게 된다고 하였다. 다음 단계에서는, 세포가 밀접된 부위에 기질이 석회화되어 완전히 석회화된 결절형성이 이루어지게 된다고 하였다.

치주인대의 결절형성 유도에 성공한 연구들은 관찰된 결절들을 치밀한 무정형의 물질[17]에서부터 무세포성 백악질의 형성[18]과 골세포가 함입되어 있는 골과 유사한 구조를 보이는 경우[19]등으로 다양하게 보고하고 있다. 이러한 현상은 치주인대세포의 다양한 이종성에 의한 것으로 해석될 수 있으며, 또한 세포의 세대수와 배지의 조성 등도 영향을 미치다고 생각된다.[19]

생체내에는 치주인대세포 다독으로 존재하는 것이 아니라 다른 세포들과 상존하기 때문에 세포간의 상호작용으로 그 양상이 다르게 나타날 것이다. Jacobsen과 Goldhaber(1972)[47]는 실험실적 실험에서 사람의 치은에서 얻어진 상피와 결합조직이 골흡수를 일으켜며, 치은구성세포가 골흡수 활성인자를 분비한다고 하였다.

본 실험에서와 같은, 치주인대세포와 치은섬유아세포의 혼합배양은 여러 조직세포로 구성된 치주조직의 복잡한 상호작용을 고려하여 계획된 실험방식으로 치은 섬유아세포가 치주인대세포의 결절형성에 대한 억제적인 작용이 있음을 관찰할 수 있으나, 치은 섬유아세포가 형태학적으로 치주인대세포와 구분이 되지 않고, 자체의 형질표현으로 인하여 전체적인 발현양상에 영향을 미치는 등 여러 요소들에 의해 결과를 해석하는데 있어서 혼합배양의 어려운 점이 존재한다. 이를 극복하는 방법으로 제안된 것이 관찰하고자 하는 세포의 유리물질이 녹아 있는 일정기간의 배양액을 채집하여 관찰하는 다른 세포를 배양하는 방법이다. 이러한 방법을 이용하여, 1991년 Ogiso등[48]은 섬유아세포가 prostaglandins을 포함한 어떤 용해성 분비인자들을 분비하여 조골 세포의 분화와 기능을 억제한다고 주장하였다.

치주인대세포는 치주조직의 재생에 있어 다양한 잠재능을 갖는 세포로서, 백악질 및 치조골의 경조직 재생능력은 치주치료에 있어서 중요한 부분을 차지한다. 그러나 치주인대세포

의 경조직 재생기전은 아직 밝혀진 바가 적으며, 주변 세포들이 분비하는 인자들에 의한 세포간 조절 기전과 경조직 재생기전에 미치는 영향에 대한 다각적인 연구는 치주조직의 재생기전의 이해와 임상적인 치주재생술의 발전에 많은 도움이 되리라 사료된다.

본 실험을 통해 치주인대세포가 경조직 재생 과정에 관여함을 확인하였고, 혼합배양을 통해 치주인대세포와 치은 섬유아세포 사이의 상호작용을 살펴보았다. 이후 치주조직을 구성하는 세포들간의 복합적인 상호작용에 대한 계속적인 연구가 필요하리하고 생각된다.

Ⅴ. 결 론

치주조직의 재생은 치주치료의 궁극적인 목표라 할 수 있고, 치주인대에서 기원하는 세포가 결합조직 뿐만 아니라 경조직형성에도 관여하는 것으로 알려져 있다.[1-6] 치주인대세포에서 석회와 결절형성을 유도함으로서 치주조직의 재생중 특히 치조골의 재생에 관여하는 치주인대세포의 역할을 확인하고, 치은 섬유아세포와의 혼합배양을 통해 두 세포간의 상호작용을 관찰함으로서 치주조직의 재생시 세포 상호간의 영향에 대하여 알아보고자 이 실험을 시행하였다.

사람의 치주인대세포와 치은 섬유아세포를 10 : 0 (1군), 7 : 3 (2군), 5 : 5 (3군), 3 : 7 (4군), 그리고 0 : 10 (5군)으로 혼합배양하여 세포증식율, ALPase 활성도, 그리고 석회화 결절수를 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포증식율은, 7일과 15일에서 모두 3군이 1군과 5군에 대하여 유의성있게 증가하였다($P<0.05$).
2. ALPase 활성도는, 치주인대세포의 비율이 감소함에 따라 효소의 활성도가 점차 감소하였다.
3. 배양 10일에서, 1군이 2군보다 ALPase 활성도가 낮게 나타났으나, 통계학적으로 유의성은 없었다.
4. ALPase 활성도는 모든 실험군에서 7일에 비하여 10일에서 증가한 것으로 나타났다($P<0.05$)
5. 결절형성은 배양 7일 경 1군에서 제일 먼저 관찰된 다음 2, 3, 및 4군에서도 결절형성이 나타났다.
6. 결절형성은 1군에서 가장 많았고 치주인대세포의 혼합비율이 낮아질수록 현저히 적어졌다. 그리고, 1, 2, 3군 사이에는 결절수의 상당한 유의성을 보였으나 ($P<0.01$), 3, 4, 5군 사이에는 통계학적인 유의성이 없었다.
7. 혼합배양인 2군이 치주인대세포만이 이와 같은 수로 단독배양한 대조군보다 결절수가 많았고($P<0.05$), 3군과 4군은 대조군과 차이가 없었다.

이상의 연구결과로부터, 치주인대세포와 치은섬유아세포의 혼합배양이 세포증식에 있어서 억제적으로 작용하는 것이 아니라 오히려 상승작용을 하며, 이는 치주인대세포라기 보다는 치은 섬유아세포의 증식이 촉진되니 것으로 추정된다. ALPase의 활성도는 치은 섬유아세포의 영향은 비교적 적고, 치주인대세포의 절대양에 의한 주로 영향을 받는 것으로 나타났으며, 결절이 형성되기 시작하면서 효소의 활성도가 감소하는 것으로 보아 ALPase는 결절형성 초기에 주로 관여하는 것으로 생각된다. 또한, 석회화 결절형성은 치주인대세포에 의해 이루어지며, 치은 섬유아세포는 치주인대세포의 결절형성 기전을 억제하는 것으로 나타났고, 배양용기내 총세포수도 결절형성에 영향을 미치는 것으로 보인다.

참고문헌

1. Melcher, A. H.: Rerair of wounds in the

periodontium of the rat influence of periodontal ligament on osteogenesis. Archs. Oral Biol., 15 : 1183-1204, 1970.

2. Melcher, A.H.: on the repair potential of periodontal tissues. J. Periodontol., 47 : 256-260, 1976.
3. Boyko, G. A., Melcher, A.H., and Brunette, D.M.: Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. J. Perio. Res., 16 : 73-88, 1981.
4. Nyman, S., Gottlow, J., Karing, T., and Lindhe, J.: The regenerative potential of the periodontal ligament. J. Clin. Periodont., 9 : 257-265, 1982.
5. karring, T., Isidor, F., Nyman, S., and Lindhe, J.: New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. J. Clin. Periodontol., 12 : 51-60, 1985.
6. Isidor, F., Karring, T., Nyman, S., and Lindhe, J.: The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. J. Clin. Periodontol., 13 : 145-150, 1986.
7. Gould, T.R.L., Melcher, A.H., and Brunett, D.M.: Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. Anat. Rec., 188 : 133-142, 1977.
8. Gould, T.R.L., Melcher, A.H., and Brunett, D.M. populations in periodontal ligament after wounding. J. Periodont. Res., 15 : 20-42, 1980.
9. McCulloch, C.A.G.: Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. Anat. Rec., 211 : 258-262, 1985.
10. McCulloch, C.A.G., and Melcher, A.H.: Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. Am. J. Anat., 167 : 43-58, 1993b.
11. McCulloch, C.A.G., and Melcher, A.H.: Cell migration in the periodontal ligament of mice. J. Periodont. Res., 18 : 339-352, 1983b.
12. Aukhil, I., Simpson, D.M., Suggs, C., and Pettersson, E.: In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. J. Clin. Periodontol., 13 : 862-868, 1986.
13. McCulloch, C.A.G., Nemeth, E., Lowenberg, B., and Melcher, A.H.: Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. Anat. Rec., 219 : 234-242, 1987.
14. Melcher, A.H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E., and Shiga, A.: Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone: a light and electron microscope study. J. Periodont. Res., 21 : 592-612, 1986.
15. Melcher, A.H., McCulloch, C.A.G., Cheong, T., Nemeth, E., and Shiga, A.: Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. J. Periodont. Res., 22 : 246-247, 1987.
16. Herr, Y., Matsuura, M., Lin, W.L., and Genco, r. J.: The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defect healing in the beagle dog. J. Periodontol., 66 : 716-730, 1995.
17. Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R.A., and Somerman, M.J.: Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. J. Periodontol., 62 : 499-503, 1991.
18. Cho, M.I., Matsuda, N., Lin, W.L.,

Moshier, A., and Ramakrishnan, P.R.: In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. Calcif. Tissue Int. 50 : 459-467, 1992.

19. Mukai, M., Yoshimine, Y., Akamine, A., and Maeda, K.: Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. Cell. Tissue Res., 271 : 453-460, 1993.
20. Iglhout, J., Aukhil, I., Simpson, D.M., Johnston, M.C., and Koch, G.: Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. J. Periodont. Res., 23 : 107-117. 1988.
21. McCulloch, C.A.G., and Bordin, S.: Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. J. Periodont. Res., 26 144-154, 1991.
22. Yamashita, Y., Sato, M., and Noguchi, T.: Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. Archs. Oral Biol., 32 : 677-678, 19987.
23. Somerman, M.J., Young, M.F., Foster, R.F., Moehring, J.M., Imm, G., and Sauk, J.J.: Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. Archs. Oral Biol., 35 : 24-247, 1990.
24. Tenenbaum, H.C.: Role of organic phosphate in mineralization of bone in vitro. J. Dent. Res., 60(Sp.Iss.C): 1986-1989, 1981.
25. Tenenbaum, H.C., and Heersche, J.N. M.: Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. Calcif. Tissue Int., 34 : 76-79, 1982.
26. Bellow, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M., and Antosz, M.E.: Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif. Tissue Int. 38 : 143-154, 1986.
27. Kasugai, S.: Bone marrow stromal cell culture as a bone formative experimental system: Technical points and applications to bone research. In: Ogura, H.(ed), Pharmacological approach to the study of the formation and the resorption mechanism of hard tissues. Ishiyaku EuroAmerica, Inc., Tokyo, pp 175-186, 1994.
28. Tenenbaum, N.C., and Palango, K.: Phospho-ethanolamine & furctose 1.6-diphosphate-induced calcium uptake in bone formed in vitro. Bone and Mineral, 2 : 201-210, 1987.
29. Tenenbaum, H.C., and Heersche, J.N.M.: Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. Endocrinology, 117 : 2211-2217, 1985.
31. Kasugai, S., Zhang, Q., Overall, C.M., Wrana, J.L., Butler, W.T., and Sodek, J.: Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein I(SPP-I, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promotor. Bone and Mineral, 13 : 235-250, 1991.
32. Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T., and Sodek, J.: Biosynthesis of bone proteins [SPP-I(secreted phosphoprotein-I, osteopontin), BSP(bone sialoprotein) and SPARC(osteonectin)] in association with mineralized tissue formation by fetal rat-calvarial cells in culture. Biochem. J., 274 : 513-520, 1991.

33. Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., and Stein, G.S.: Progressive development of the rat osteoblast in vitro : Reciporocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J. Cell. Physiol., 143 : 420-430, 1990.
34. Beresford, J.N., Graves, S.E., and Smoothy, C.A.: Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: A model of bone formation? Am. J. Medical Genetics, 45 : 163-178, 1993.
35. Beertsen, W., and Theo Van Den Bos: Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. Matrix, 9 : 159-171, 1989.
36. Anderson, H.C.: Mechanism of mineral formation in bone. Lab. Invest., 60 : 320-330, 1989.
37. Bellows, C.G., Aubin, J. E., and Heersche, J.N.M.: Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone and Mineral, 14 : 27-40, 1991.
38. De Benard, B.: Glycoproteins in the local mechanism of calcification. Clin. Orthop., 162 : 233-244, 1982.
39. Fujisawa, R., and Kubok, Y.: Affinity of bone sialoprotein and several other bone and dentin acidic proteins to collagen fibrils. Calcif. Tissue Int. 51 : 438-422, 1992.
40. Gorski, J.P.: Acidic phosphoproteins from bone matrix: A structural rationalization of their role in biomineralization. Calcif. Tissue Int. 50 : 391-396, 1992.
41. Kasugai, S., Nagata, T., and Sodek, J.: Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopoontin(OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. J. Cell. Physiol., 152 : 467-477, 1992.
42. Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T., and Sodek, J: Biosynthesis of bone proteins [SPP-1(secreted phos-phoprotein-1, ostseopontin), BSP(bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. Biochem. J., 274 : 513-520, 1991.
43. Rao, L. G., Moe, H.K., and Heersche, J.N.M.: In-vitro culture of porcine periodontal ligament cells : response of fibroblast-like and epithelial-like cells to prostaglandin E1, parathyroid hormone and calcitonin and separation of a pure population of fibroblast-like cells. Archs. Oral Biol., 23 : 957-964, 1978.
44. Nojima, N., Kobayashi, M., Shionome, M., Takahashi, N., Suda, T, and Hasegawa, K.: Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. J. Periodont. Res., 23 : 179-185, 1990.
45. Maniatopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A.H.: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell. Tissue Res., 254 : 317-329, 1988.
46. Ramakrishnan, P.R., Lin, W.L., Sodek, J., and Cho, M.I.: Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat

periodontal ligament cells in vitro. Calcif. Tissue. Int., 57 : 52-59, 1995.

47. Jacobsen, N., and Goldhaber, P.: bone resorption induced by epithelial and connective tissue from human gingiva in vitro. J. Dent. Res., 51 : 1683-1689, 1972.

48. Ogiso, B., Hughes, F.J., Melcher, A.H., and McCulloch, C.A.G.: Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. J. Cell. Physiol., 146 : 442-450, 1991.

- Abstract -

The Effects Of Calclfied Nodule Formation On Co - Cultre Of Periodontal Ligament Cells And Gingival Fibroblasts.

Young - Mi In, Joon - Bong Park, Man - Sup Lee, Young - Hyuk Kwon
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Kyung - Hee University

The goal of periodontal therapy is to regenerate the loss of periodontal attachment appratus. Current theories suggest the cells of the periodontium have the capacity, when appropriately triggered, to actively participate in restoring connective tissues, including mineralized tissues.

This study was performed to define the hard tissue regeneration effect of periodontal ligament(PDL) cells in vitro and the effect of rate of the composition in gingival fibroblasts(GF) on the hard tissue regeneration capacity of PDL cells. For this study, Cell growth rate, alkaline phosphatase(ALPase) levels and the ability to produce mineralized nodules in co - culture of PDL cells and GF were examined.

The results were as follows :

1. At 7 and 15 days, Cell growth of co - culture of PDL and GF(50 : 50) was greater than that of PDL cells or GF alone($P>0.05$).
2. Measurements of ALPase levels indicated that PDL cells had significantly higher activity when compared with that of co - culture groups and GF only($p<0.05$). And, ALPase activity in 10 days was higher than that of 7 days($P>0.05$)
3. The tendency of formation of the mineralized nodule were observed dose - depend pattern of PDL cells. There was statistically significant difference among group 1(PDL 100%), 2(PDL 70% : GF 30%), and 3(PDL 50% : GF 50%)($P<0.01$). But, there was no difference among group 3, 4(PDL 30% GF 70%), and 5(GF 100%).
4. Also, the number of nodule was greater in co - culture of PDL 70% and GF 30% than in culture of PDL 70%($P<0.05$)

From the above results, it is assumed that the co - culture of PDL cells and GF stimulates the cell growth, which is not that of PDL cells but GF. And, the activity of ALPase depends on the ratio of PDL cells, and ALPase may relate to the initial phase of nodule formation. Also, it is thought that the calcified nodule formation principally depends on PDL cells, is inhibited by GF, and affected by cell density.