

Minocycline 및 TGF- β 1이 배양 인체 치은섬유모세포와 치주인대세포에 미치는 영향

운동환 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주질환은 치은 염증과 치아주위 결체조직의 소실, 치조골의 흡수, 치주낭 형성등으로 특징되어지는 만성 염증성 질환이다. 치주질환에 의해 파괴된 치주 조직의 재생을 위해 치은 소파술, 치근 활택술 등과 같은 비외과적 처치와 치주 판막술, 골 이식술^{1, 2, 3)} 등과 같은 다양한 외과적 술식이 소개되었다. 그러나 이러한 술식만으로는 완전한 신부착의 획득이 어렵고 대부분의 경우 긴 상피접합의 형태로 치유된다. 이러한 형태의 치유를 극복하기 위한 치주 재생에 필요한 초기 요인 중의 하나가 치유부에서 섬유모세포의 부착과 전개 그리고 증식이다. 최근의 연구들은 치은^{3, 4)}과 치주인대⁵⁾ 모두 치주조직을 재생시킬 수 있는 능력을 가진 많은 서로 다른 세포들을 포함한다고 하였다.

몇몇 연구에서 치근면을 포함한 하부 구조에 이들 세포의 부착과 증식을 증가시키는 능력을 가진 약제와 치료술식을 평가하는데 초점이 맞춰져 왔으며 신부착을 이루기 위한 많은 보조적 술식이 연구되었다.^{6, 7, 8)} 이러한 술식에는 보조적 약제에 의한 치근면 처리^{9, 10, 11)}, 조직 유도 재생술(Guided Tissue Regeneration, GTR)^{12, 13, 14, 15)} 등이 포함된다. Aleo 등^{16, 17)}과

Olson 등¹⁸⁾은 치주질환에 이환된 백악질내에, Gilman과 Maxey¹⁹⁾은 치석내에, 그리고 Baboolal 등²⁰⁾은 치태내에 각각 세포에 독성을 미치는 물질들이 존재하므로 조직의 재부착이 어렵다고 하였다. 이와 같은 보고를 근거로 치근면 처리에 사용되는 약제에는 citric acid²¹⁾, fibronectin^{4, 22, 23)}, tetracycline²⁴⁾ 등이 있다. 조직 유도 재생술은 expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)막과 같은 물리적 차단막을 사용함으로써 치주인대 또는 치조골의 재형성이 보다 용이하게 되도록 한다.²⁵⁾ 이와 더불어 최근 신부착을 유도하는데 있어 또 다른 시도가 행해지고 있는데 이는 polypeptide growth factor 라고 알려진 분자 집단(molecular group)을 이용한 치주인대 세포의 이주, 부착 및 증식의 도입이다.²⁶⁾ 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 치주 창상의 치유에 있어 중요한 역할을 담당한다.

Tetracycline에는 항균 효과(antimicrobial effect)^{27, 28)}, 교원질 분해효소 활성의 저해효과²⁹⁾, 부갑상선 호르몬과 관련된 골 흡수의 저해효과²⁹⁾, 치근면을 탈회시키는 능력^{24, 28)}, 그리고

섬유모세포에 직접 작용하여 세포의 부착과 전개를 증진시키는 능력³⁰⁾ 등이 있다고 보고되어 왔다.

Minocycline은 tetracycline계열의 항생제로서 작용 기전이 서로 유사하며 국소적 및 전신적으로 투여시 치태의 형성을 효과적으로 억제하며 소량의 투여에도 불구하고 tetracycline에 비해 치은 열구액내의 약제 농도가 높게 유지된다는 Baker 등³¹⁾의 연구보고와 tetracycline보다 항균 효과가 높고 내성균의 출현 비율이 낮게 나타난다는 Genco³²⁾의 보고, 그리고 섬유모세포에 대한 부착효과가 tetracycline보다도 더 우수하다는 Somerman³⁰⁾ 등의 보고를 근거로 본 실험에 사용하였다.

Growth factor의 일종인 TGF(Transforming growth factor)는 TGF- α 및 TGF- β 로 분류되며 이들은 각기 정상과 신생 조직으로부터 분리되었으며 구조적 및 기능적으로 관련이 없다. TGF- β 는 25,000 Da의 분자량을 가진 dimeric polypeptide로서 TGF- β 1, TGF- β 2 및 TGF- β 3의 세 가지 형태로 구분되며 골과 혈소판이 주요 기원이다.^{33, 34, 35)} 이는 상피 세포의 증식을 억제하고 간엽세포의 증식을 자극한다.^{36, 37)}

또한 섬유모세포의 화학 주성 능력과 증식을 자극하며 세포외 기질의 생성을 유도한다.^{38, 39)} 그리고 TGF- β 는 실험실의 배양 조건에 따라 조골 세포 증식에 억제^{40, 41)}와 자극⁴²⁾의 상반된 효과를 보인다. TGF- β 는 다른 PDGF, IGF, FGF 등의 polypeptide growth factor와 함께 적용시 상승작용을 보이는 것으로 알려졌다.⁴³⁾

본 실험은 minocycline과 TGF- β 를 치은 섬유모세포와 치주인대 세포에 적용했을 때 각각의 부착능과 활성도의 측정을 유사한 계대의 세포와 동일한 실험 방법으로 평가함으로써 두 약제 사이에 세포 부착과 활성화에 미치는 영향이 어떻게 다른지를 비교하고 세포 부착과 활성화에 가장 적절한 농도를 산출해 내기 위해 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 치은 섬유모세포와 치주인대 세포의 배양

본 연구에서 사용된 치은 섬유모세포와 치주인대 세포는 교정적 이유로 발거된 소구치나 매복된 제3대구치의 치은과 치주인대를 절제하여 얻었다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태를 임상 및 방사선학적으로 평가하였다.

발거된 치아를 HBSS(H6136, Hank's Balanced Salt Solution, Gibco Co., USA)가 담겨 있는 15ml tube에 담아 3회 세척하여 잔존하는 혈액 등을 제거하였다. 세척된 치아를 100mm 조직배양용 접시에 옮겨 15번 blade를 사용하여 우태아 혈청(Fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 10% 항생제(Penicillin G 10000 μ g/ml, Streptomycin 25 μ g/ml, Amphotericin B 포함, Gibco Co., USA) 1%를 포함한 α -MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co., USA)내에서 치경부에 붙어 있는 치은 조직과 치근 중간 1/3에 있는 치주인대 조직을 떼어 내어 이들을 1mm²으로 세절하여 60mm 조직배양용 접시에 5~6개의 조각을 위치시켰다. 그 후 약 30분간 37°C, 5% CO₂, 습도 100%의 배양기에서 배양 접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 각 배양 접시당 상기의 배양액 3ml씩을 첨가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 2~3일 간격으로 배양액을 교환하며 배양하였다.

단일 세포층이 confluency에 도달했을 때 배양액을 제거하고 HBSS로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거하고 0.25% Trypsin/EDTA(10X, Gibco, USA)를 2ml씩 넣고 3분간 clean bench상에 방치한 후 배양접시에 부착된 세포를 분리시켜 15ml 원심 분리용 시험관으로 옮겨 1,200rpm으로 10분간 원침하

었다. 원침 후 상층액을 따라내고 HBSS를 가지고 Vortex mixer로 혼합 세척한 후 다시 1200rpm으로 10분간 원침하였다. 다시 상층액을 따라내고 α -MEM을 첨가하여 Vortex mixer로 혼합하여 세포 부유액을 만들고 이를 60mm 조직 배양용 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2~3일 간격으로 교환하였고 계대 배양은 1 : 3~4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 5~8회 계대 배양된 치은 섬유모세포와 치주인대 세포를 이용하였다.

2) Minocycline과 TGF- β 1의 준비

Minocycline(M9511, Sigma chemical company, USA)을 희석하여 2, 20, 50, 100, 200 μ g/ml의 농도로 준비하였는데 이러한 농도는 Gomes²²⁾ 등의 20~100 μ g/ml 농도에서 organ culture시 부갑상선 호르몬과 연관된 골 흡수가 억제된다는 연구결과에 기초하였다.

Human recombinant TGF- β (T-7164, Sigma chemical company, USA)은 97% 이상의 순도를 가지며, 0.1, 1, 10, 20 ng/ml의 농도로 실험해 이용하기 위해 4mM HCl을 함유한 배양액으로 stock solution을 만든 다음 실험 직전 각 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 세포 부착능 검사

5~8회 계대 배양된 치은 섬유모세포와 치주인대 세포를 0.25% Trypsin/EDTA로 떼어내어 trypan blue로 염색 후 hemocytometer로 세포수를 세어 24-well plate의 각 well 당 1×10^5 의 세포가 위치되도록 분주하고 분주와 동시에 minocycline 각각의 농도와 TGF- β 1 각각의 농도를 첨가하고 1.5, 3, 6시간 동안 각각 배양하였다. Minocycline 실험군에는 α -MEM용액을 대조군으로 사용하였고 TGF- β 1 실험군에서는 4mM HCl이 함유된 α -MEM용액을 대

조군으로 사용하여 역시 1.5, 3, 6 시간 동안 배양하였다. 각각의 시간이 경과된 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 제거하고 새로운 α -MEM 1ml을 각각의 well에 첨가하였다. 이어서 24-well plate의 바닥에 부착되어 있는 세포의 양을 알아보기 위해 생리 식염수로 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate 상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣고 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

매 실험마다 세포 부착능을 대조군의 백분율로 산출하였다. 그리고 각각의 실험군은 치은 섬유모세포의 경우 5배수로, 치주인대 세포는 3배수로 하였다.

$$\text{세포부착능} = \frac{\text{실험군의 세포 부착능}}{\text{대조군의 세포 부착능}} \times 100$$

2) 세포 활성도 검사

5~8회 계대 배양된 치은 섬유모세포와 치주인대 세포를 0.25% Trypsin/EDTA로 떼어내어 trypan blue로 염색 후 hemocytometer로 세포수를 세어 24-well plate의 각 well당 1×10^4 의 세포가 위치되도록 분주하고 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 37°C, 5% CO₂, 100% 습도의 배양기에서 배양하였다. 배양 후 minocycline 각각의 농도와 TGF- β 1 각각의 농도를 첨가하고 1, 2, 3일 동안 각각 배양하였다. minocycline 실험군에는 α -MEM만을 대조군으로 하였고 TGF- β 1 실험군에는 4mM HCl이 함유된 α -MEM을 대조군으로 하여 역시 1, 2, 3일간 배양하였다. 각각의 시간이 경과된 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 제거하고 새로운 α -MEM 1ml을 각각의 well에 첨가하였다. 이어서 상기

의 부착능 검사와 같은 방법으로 MTT assay 를 실시하여 ELISA analyser로 흡광도를 측정 하였다.

매 실험마다 세포 활성도를 대조군의 백분율로 산출하였다. 그리고 각각의 실험군은 치은 섬유모세포의 경우 5배수로, 치주인대 세포는 3배수로 하였다.

$$\text{세포 활성도} = \frac{\text{실험군의 세포 활성도}}{\text{대조군의 세포 활성도}} \times 100$$

3) 통계분석

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포 부착과 활성의 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 통계분석

하였다.

III. 실험 결과

1. Minocycline이 치은 섬유모세포와 치주인대 세포의 부착에 미치는 영향 (Table 1)

1) Minocycline이 치은 섬유모세포의 부착에 미치는 영향

치은 섬유모세포는 minocycline 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 대조군과 비교하여 부착도의 증가를 보이기 시작하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지는 농도의존형의 증가를 보였고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 최대 부착으로부터 감소되는 양상을 보였다(P<0.05).

Table 1. Effects of Minocycline on Cell Attachment

mino \ hour	GF			PDL		
	15	3	6	15	3	6
Control	100.00 \pm 14.49	100.00 \pm 6.31	100.00 \pm 11.56	100.00 \pm 3.33	100.00 \pm 12.19	100.00 \pm 1.50
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	89.9 \pm 8.49	107.64 \pm 6.57	99.40 \pm 9.43	100.63 \pm 4.63	102.07 \pm 5.12	116.13 \pm 5.74*
20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	106.76 \pm 21.05	115.04 \pm 4.97*	99.84 \pm 14.22	131.93 \pm 3.26*	125.27 \pm 4.10*	115.67 \pm 10.10
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	131.00 \pm 15.38*	125.10 \pm 13.10*	120.62 \pm 6.93*	154.90 \pm 8.94*	146.70 \pm 5.87*	136.37 \pm 11.48*
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	120.56 \pm 12.51	120.50 \pm 6.69*	105.14 \pm 16.55	170.27 \pm 7.23*	148.13 \pm 9.78*	113.63 \pm 12.15
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	111.46 \pm 22.61	116.32 \pm 6.15*	108.40 \pm 8.22	141.93 \pm 8.49*	122.73 \pm 4.24*	113.43 \pm 2.45

Mean(%) \pm SD

* : Significantly different from the control value (p<0.05)

Mino : Minocycline GF : Gingival Fibroblasts

PDL : Periodontal Ligament Cells

2) Minocycline이 치주인대 세포의 부착에 미치는 영향

치주인대 세포는 minocycline 20 μ g/ml의 농도에서부터 대조군과 비교하여 유의한 부착도의 증가를 보이기 시작하여 100 μ g/ml까지는 농도의존형의 부착증가를 보였으며 200 μ g/ml의 농도에서는 최대 부착으로부터 약간 감소되었다 (P<0.05).

치은 섬유모세포와 치주인대 세포 모두 동일한 농도군 내에서는 1.5 시간의 군에서 대조군에 비해 부착도가 가장 높았으며 시간이 경과할수록 대조군과 실험군 사이의 부착된 세포수의 차이가 점점 줄어드는 양상을 보여주고 있다.

2. TGF- β 1이 치은 섬유모세포와 치주인대 세포의 부착에 미치는 영향 (Table 2)

TGF- β 1을 치은 섬유모세포와 치주인대 세

포에 투여하였을 경우 부착도가 대조군에 비해 비슷하거나 약간 낮아지는 양상을 보였다. 특히 6시간 실험군에서는 치은 섬유모세포의 1.0ng/ml의 농도에서 유의한 부착 감소를 보였고 치주인대 세포의 0.1ng/ml과 10ng/ml의 농도에서도 유의한 부착 감소를 보였다(P<0.05).

3. Minocycline이 치은 섬유모세포와 치주인대 세포의 활성화에 미치는 영향 (Table 3)

치은 섬유모세포와 치주인대 세포 모두 50 μ g/ml 이상의 고농도의 minocycline 투여시에는 대조군과 비교하여 세포 활성화의 유의한 감소를 보였다(P<0.05). 또한 농도가 증가할수록 세포 활성화가 감소되는 양상을 보였다. 동일 농도에서의 시간 경과에 다른 세포 활성화의 변화는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그러나 가장 저농도인 minocycline 2 μ g/ml에서는 예외적으로 1일군의 치주인대 세포에서 유의한 활성화의 증

Table 2. Effects of TGF- β 1 on Cell Attachment

hour TGF- β 1	GF			PDL		
	1.5	3	6	1.5	3	6
Control	100.00 \pm 14.29	100.00 \pm 5.26	100.00 \pm 3.71	100.00 \pm 8.86	100.00 \pm 11.71	100.00 \pm 8.50
0.1ng/ml	95.68 \pm 12.17	104.02 \pm 12.97	84.22 \pm 15.90	95.07 \pm 5.76	104.00 \pm .90	82.77 \pm 5.29*
1.0ng/ml	91.44 \pm 2.60	109.62 \pm 12.12	73.20 \pm 10.74*	83.30 \pm 4.16*	118.83 \pm 10.80	95.83 \pm 6.13
10ng/ml	93.56 \pm 17.52	105.54 \pm 18.42	89.30 \pm 30.08	101.53 \pm 7.77	91.90 \pm 5.22	83.97 \pm 4.27*
20ng/ml	103.86 \pm 11.15	108.64 \pm 16.22	89.86 \pm 19.36	95.63 \pm 2.21	93.20 \pm 5.15	93.10 \pm 11.63

Mean(%) \pm SD

* : Significantly different from the control value (p<0.05)

GF : Gingival Fibroblasts

PDL : Periodontal Ligament Cells

Table 3. Effects of Minocycline on Cell Activity

day mino	GF			PDL		
	1	2	3	1	2	3
Control	100.00± 4.72	100.00± 8.86	100.00± 13.89	100.00± 7.11	100.00± 4.35	100.00± 9.65
2µg/ml	113.24± 6.65	82.04± 9.21	97.20± 19.02	116.43± 4.84*	106.77± 4.00	85.33± 7.43*
20µg/ml	87.78± 14.49	83.14± 3.48*	97.38± 11.04	93.37± 5.48	104.60± 5.85*	103.90± 13.60
50µg/ml	63.86± 26.07*	68.26± 6.49*	84.82± 26.61	63.47± 3.11*	88.50± 5.14*	89.80± 13.43
100µg/ml	50.08± 21.53*	51.82± 18.90*	64.58± 31.36*	45.37± 5.01*	43.07± 11.18*	45.37± 6.32*
200µg/ml	54.04± 24.40*	46.70± 17.05*	58.38± 30.02*	59.20± 4.67*	52.87± 2.65*	47.50± 7.56*

Mean(%) ± SD

* : Significantly different from the control value (p<0.05)

Mino : Minocycline GF : Gingival Fibroblasts

PDL : Periodontal Ligament Cells

Table 4. Effects of TGF-β1 on Cell Activity

day TGF-β1	GF			PDL		
	1	2	3	1	2	3
Control	100.00± 3.29	100.00± 8.05	100.00± 16.87	100.00± 8.55	100.00± 5.15	100.00± 4.80
0.1mg/ml	114.20± 11.35	106.30± 20.83	108.37± 20.62	121.77± 10.58	114.97± 14.90	119.83± 6.94*
1.0mg/ml	110.08± 19.99	110.04± 24.17	111.17± 16.11*	116.00± 9.24	109.83± 5.57	128.00± 5.29*
10mg/ml	83.62± 26.52	98.32± 28.16	103.18± 4.00	103.13± 1.75	111.47± 7.78	154.97± 4.80*
20mg/ml	84.56± 21.93	97.86± 25.63	100.83± 12.91	100.43± 6.47	118.80± 9.90	180.63± 14.60*

Mean(%) ± SD

* : Significantly different from the control value (p<0.05)

GF : Gingival Fibroblasts

PDL : Periodontal Ligament Cells

가를 보였다(P<0.05).

4. TGF- β 1이 치은 섬유모세포와 치주인대 세포의 활성화에 미치는 영향 (Table 4)

1) TGF- β 1이 치은 섬유모세포의 활성화에 미치는 영향

치은 섬유모세포의 경우 TGF- β 1 전 농도에서 1, 2, 3일군 모두 대조군과 비교하여 세포 활성화에 있어 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으나 저농도에서 약하게 증가하는 경향을 보였다(P<0.05).

2) TGF- β 1이 치주인대 세포의 활성화에 미치는 영향

치주인대 세포의 경우 시간이 경과함에 따라 세포 활성화가 점차 증가하는 것으로 나타났으며 특히 3일군에서는 전 농도에 걸쳐 대조군에 비해 유의한 활성을 보였다. 또한 3일군에서는 활성화의 증가가 농도 의존형으로 나타났으며 최대의 활성화도는 3일군 20ng/ml의 농도를 투여했을 때로 나타났다(P<0.05).

IV. 총괄 및 고찰

치주치료의 목적은 조직에 확산된 염증을 제거하고 질환으로 인하여 소실된 치주 조직의 재생을 유도하는 과정 즉 치조골 및 백악질의 형성과 이를 피개하는 결체조직 부착을 형성하여 궁극적으로는 치주낭의 재형성을 막아 치주질환의 재발을 예방하는 것이다.⁴⁴⁾

치주조직의 재생에 관여하는 세포로는 치은 상피세포, 치은 결체조직 세포, 치조골 세포, 치주인대세포 등이 있다. 이들 세포 중 Bower³⁾ 등은 치은 섬유아세포가 치주조직 재생에 주로 관여한다고 주장한 바 있으나 Bokyo⁴⁵⁾ 등은 치은 결체 조직세포와 치조골 세포가 치근면과 직접 접촉하였을 경우에는

치근 흡수와 골성 강직을 초래한다고 주장하였고 Stahl⁸⁾은 치은 상피 세포의 빠른 증식에 의해 치주낭 내면에 재상피화가 일어나면 치근 흡수와 골성 강직을 동시에 예방할 수 있으나 치주낭의 재형성 가능성이 높게 된다고 주장하였다. 이와는 달리 Melcher^{7, 46)} 등과 Isidor⁵⁾는 치주인대에서 유래된 치주인대 세포가 치근면과 접촉하여 새로운 백악질이 형성되며 기능적인 섬유 배열을 가진 치주인대의 재생이 일어나 바람직한 치유 형태가 나타난다고 보고하였다. 치주인대 세포는 고도로 조직화된 cellular organelle을 지닌 고도의 cellular polarization을 보이며^{47, 48)} 매우 높은 교원질 합성율을 보이고 신생 교원질 분자의 중합에 가장 효과적이며⁴⁹⁾ 조골 기능을 가지며^{50, 51, 52)} 백악질 생성에 관여하는 기능을 갖는다고 알려졌다. 치주 창상의 치유는 구강 상피의 근단부 이동이 차단되어야 하며 치주인대, 치조골 세포 등에 의해 상실된 부착기구가 재생되어야만 한다.¹²⁾ 치주 창상부에서 치은 결체조직과 상피의 배제를 위한 GTR의 원리는 이들 창상부에 치주인대 또는 치조골의 재근집이 보다 더 용이하도록 해주는 것이다.

본 연구에서 사용한 minocycline은 tetracycline 계열의 항생제로서 작용 기전이 유사하며 국소적 및 전신적으로 투여시 치태의 형성을 효과적으로 억제하며 소량의 투여에도 불구하고 tetracycline에 비해 치은 열구액내의 억제 농도가 높게 유지된다는 Baker 등³¹⁾의 연구보고와 tetracycline보다 항균 효과가 높고 내성균의 출현 비율이 낮게 나타난다는 Genco³²⁾의 보고, 그리고 섬유아세포에 대한 부착효과가 tetracycline보다 더 우수하다는 Somerman 등의 보고를 근거로 본 실험에 사용하였다.³⁰⁾ Terranova 등²⁴⁾은 tetracycline이 실험에서 mg단위의 범위에서 치근면에 대한 세포부착을 증진시킴을 보고하였다. 이러한 사실은 chelating agent로서의 tetracycline의 효과, 즉 치근면을 탈회함으로써 간접적으로 세포 부착을 증진시

키는 것으로 설명하였으며 Wikesjo 등⁵³⁾은 광범위 항생제인 tetracycline을 치근면에 도포한 결과 약제의 산도에 의한 치근면 탈회로 교원질이 노출되고 노출된 교원질에 의해 상피 세포의 근단 방향으로의 이동이 차단되며 치은 섬유모세포의 부착이 촉진된다고 보고하였다. 또한 Somerman 등²⁹⁾은 minocycline이 섬유모세포에 직접 작용하여 세포의 부착도를 증진시킨다고 하였다.

본 실험에서 관찰되어진 minocycline의 세포 부착 및 활성도에 대한 직접적인 효과의 양상은 Somerman 등³⁰⁾의 연구결과와 동일하게 나타났다. Somerman 등은 섬유아세포에 대한 minocycline의 직접적 영향을 관찰한 실험에서 minocycline이 세포의 부착을 촉진하며 전신투여시 용량이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 치주낭의 미생물총을 감소시키며 부작용이 가장 적다고 하였다.^{54, 55)} 그리고 높은 농도의 minocycline은 세포의 확산을 방해하여 치근면에 결합조직 세포의 부착을 방해하며 24시간 이상 minocycline 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에 세포를 노출시키는 경우 최소의 세포부착을 야기하며 결국 세포의 활동성 상실을 초래한다고 하였다.

본 연구의 결과를 보면 치은 섬유모세포의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline을 투여한 군에서 최대의 부착을 나타내었으며 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 최대 부착으로부터 감소되는 양상을 보여주고 있다. 또한 시간이 경과할수록 같은 농도에서 점차로 실험군의 부착도와 대조군의 부착도 사이의 차이가 줄어들음을 관찰할 수 있었다. 이는 1.5시간 후까지 세포가 collagen 등과 같은 부착 촉진 물질이 바닥 표면에 처리된 배양접시에 90% 이상이 부착한다는 Klebe⁵⁶⁾의 실험 결과와 동일한 결과로써 minocycline에 의해 부착이 촉진된 실험군과 대조적으로 대조군의 경우 부착할 수 있는 잔존 세포들이 더 많이 존재하므로 3시간 이상에서도 지속적으로 부착하여 실험군과의 차이가 줄어들기 때문일 것으로 생각된다. 반면 치

주인대 세포는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 최대의 부착을 보였으며 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 부착이 감소되는 양상을 관찰할 수 있었다. 본 실험의 연구 결과에서 치주인대 세포와 치은 섬유모세포 사이에 minocycline에 대한 노출시 최대 부착을 보이는 농도가 서로 다르게 나타났으며 서로 다른 농도에서 유사한 결과를 보이는 이유는 두 세포의 특성 중 세포 부착에 영향을 미칠 수 있는 요인이 약제에 의해 변화할 수 있기 때문이며, 즉 minocycline이 양세포 공히 화학적 유인물로서의 작용과 세포 표면에 존재하는 수용체 변화를 야기하기 때문인 것으로 사료된다.

Minocycline의 세포 활성도에 미치는 영향에 대한 연구 결과는 고농도에서 24시간 이상 세포를 노출시킬 경우 세포에 유해한 결과가 온다는 Somerman³⁰⁾의 실험 결과와 마찬가지로 대조군의 활성도에 미치지 못하는 결과를 보였다.

Growth factor에 대한 최근의 연구들에 의해 치주질환에 의해 파괴된 치주 조직에 재생에 growth factor가 보조적인 치료 방법으로써 제공되었다. TGF- β 1은 상피 세포 유래의 세포들에 대한 potent inhibitor이며 반면에 섬유모세포나 골아세포와 같은 Mesenchymal origin의 몇몇 cell type의 증식을 촉진함이 밝혀졌다. 본 실험 결과 TGF- β 1은 세포의 부착에는 효과가 없는 것으로 나타났으며 세포의 활성도, 특히 치주인대 세포의 활성도에 장기간 노출시 높은 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 초기 치은 섬유모세포에 대한 TGF- β 1의 실험실 연구에서 세포에 최소의 증식 자극 효과를 보이며 TGF- β 1에는 치은 섬유모세포를 증식시키는 효과가 없다는 Piche 등⁵⁷⁾의 연구 결과와 일치한다. 또한 치주인대 세포에 대한 TGF- β 1의 효과를 연구하여 TGF- β 1이 치주인대 세포의 증식을 촉진한다는 Oates 등⁴³⁾의 연구 결과와 TGF- β 1의 치주인대 세포에 대한 특이적인 세포활성의 증대를 보고한

Dennison²⁵⁾ 등의 연구 결과와도 일치하였다. 치주조직의 재생을 위한 models은 치주인대 세포와 골아세포 유사세포의 촉진과 함께 상피 세포와 치은 섬유모세포의 억제를 요구한다. 이러한 조건은 TGF- β 1으로 이루어진다. 결론적으로 이들 결과는 창상치유에 있어 TGF- β 1의 적용을 지지하며 특히 골유도성의 잠재력에 의해 치주 질환부에서의 사용이 추천된다.

본 실험 결과는 다양한 원인 인자가 상존하는 구강내의 환경과는 차이가 있고 시험관적 실험(in vitro)이 조직에서의 반응과는 동일한 결과가 창출되지 않을 것이라는 점을 감안할 때 본 연구 결과를 토대로 minocycline과 TGF- β 1을 치주수술 과정에서 직접 도포하여 치주인대를 구성하는 세포들의 치유과정을 관찰하는 연구들이 지속되어야 할 것으로 사료되며 아울러 minocycline에 의해 초기 부착을 증진시킨 후 이어서 TGF- β 1으로 활성을 증가시키는 연구도 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

치은 섬유모세포와 치주인대 세포에 minocycline 2, 20, 50, 100 및 200 μ g/ml와 TGF- β 1 0.1, 1, 10 및 20ng/ml를 투여하여 세포의 부착도와 활성도를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Minocycline은 치은 섬유모세포와 치주인대 세포의 부착을 촉진하며 일정 농도까지는 세포의 부착을 농도의존형으로 증진시키나 최대 세포 부착 농도(치은 섬유모세포 : 50 μ g/ml, 치주인대 세포 : 100 μ g/ml) 이상의 농도에서는 최대 부착으로부터 감소되는 경향을 보였다. 반면에 활성도에 대한 minocycline의 효과는 시간이 경과할수록, 또한 농도가 증가할수록 활성도를 감소시켰다.

2. TGF- β 1은 두 세포 모두 부착을 증진시키지는 못하지만 치주인대 세포의 경우 시간이 지나면 지날수록 세포 활성도를 증진시키는 것으로 밝혀졌다.

이상의 결과에서 minocycline은 치은 섬유모세포 및 치주인대 세포의 부착에 영향을 미치며 TGF- β 1은 치주인대 세포의 활성을 증가시키는 효과가 있음을 알았다.

참고문헌

1. Schallhorn RG, Hiatt WH.: Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal defects. II. Clinical observations. J Periodontol 43 : 67-81, 1972.
2. Dragoo MR. Sullivan HC.: Clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans: Part I. Wound healing 2 to 8 months. J Periodontol 44 : 599-613, 1973.
3. Bowers GM, Schallhorn RG. Melonig JT.: Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. J Periodont 53 : 509-514, 1982.
4. Fernyhough W, Page RC.: Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin treated normal and diseased tooth roots. J Periodont 54 : 133-140, 1983.
5. Isidor F, Karring T, Nyman S, et al.: The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. J Clin Periodont 13 : 145-150, 1986.
6. Ellegaard B, Karring T, Loe H.: New periodontal attachment procedure based on retardation of epithelial migration. J Clin

- Periodont 1 : 75-88, 1974.
7. Melcher AH.: On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodont* 47 : 256-260, 1976.
 8. Stahl SS.: Repair or regeneration following periodontal therapy: *J Clin Periodont* 6 : 389-396, 1979.
 9. Cole RT, Crigger M, Bogle G, Egelberg J, Selvig K.A.: Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological Study. *J Periodont Res* 15 : 1-9, 1980.
 10. Terranova VP, Wikesjo UME.: Extracellular matrices and polypeptides growth factors as mediators of functions of cells of periodontium. A review. *J Periodont* 371-380, 1987.
 11. Hanes PJ, Polson AM.: Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surface. *J Periodont* 60 : 188-198, 1989.
 12. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J.: New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodont* 11 : 494-503, 1984.
 13. Magnusson I, Nyman S, Karring T, Egelberg J.: Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. *J Periodont Res* 20 : 201-208, 1985.
 14. Blumenthal NM.: The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. *J Periodont* 59 : 830-836, 1988.
 15. Caffesse RG, Smith BA, Castell WA, Nasjleti CE.: New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol* 59 : 589-594, 1988.
 16. Aleo JJ, DeRenzis FA, Faber PA, Varboncoeur AP.: The presence and biologic activity of cementum bound endotoxin. *J Periodont* 45 : 672-675, 1974.
 17. Aleo JJ, DeRenzis FA, Faber PA.: In vitro attachment of human gingival fibroblast to root surface. *J Periodont* 46 : 639-645, 1975.
 18. Olson RH, Adams DF, Layman DL.: Inhibitory effect of periodontally diseased root extracts on the growth of human gingival fibroblasts. *J Periodont* 56 : 592-596, 1985.
 19. Gilman RS, Maxey BR.: The effect of root detoxification on human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 57 : 436-440, 1986.
 20. Baboolal R, Mlinek A, Powell RN.: A study of the effects of gingival plaque extracts on cells cultured in vitro. *J Periodont Res* 5 : 248-254, 1970.
 21. Register AA, Burdick F.: Accelerated re-attachment and cementogenesis to dentin, demineralized in situ (I) optimum range. *J Periodontol* 46 : 646-655, 1975.
 22. Terranova VP, Martin CR.: Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth surface. *J Periodont Res* 17 : 530-533, 1982.
 23. Caffesse RG, Holden MJ, Kon S, et al.: The effect of citric acid and fibronectin application on healing following surgical treatment of naturally occurring periodontal disease in beagle dogs. *J Clin Periodont* 12 : 578-590, 1985.
 24. Terranova VP, Franxetti LC, Hick S, et al.: A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment of

- dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodont Res* 21 : 330-337, 1986.
25. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG: Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodont* 65 : 641-648, 1994.
 26. 정순규, 남궁혁, 신형식 : PDGF와 TGF- β 1이 배양 인체 치은 섬유모세포와 치주인대 세포의 활성화에 미치는 영향. 대한 치주과 학회지 25 : 133-144, 1995.
 27. Ciancio SG, Mather M, McMullen J.: An evaluation of minocycline in patients with periodontal disease. *J Periodont* 51 : 530-534, 1980.
 28. Bjorvatin K, Skaug N.: Intraoral bacterial growth on tetracycline-impregnated dentin. *Scand J Dent Res* 94 : 95-101, 1986.
 29. Gomes BC, Golub LM, Ramamurthy NS.: Tetracyclines inhibit parathyroid hormone-induced bone resorption in organ culture. *Experimenta* 40 : 1273-1275, 1984.
 30. Somerman MJ, Foster RA, Vorsteg G, Progenin K, Wynn RL.: Effects of minocycline on fibroblast attachment and spreading. *J Periodont Res* 23 : 154-159, 1988.
 31. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ.: Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *J Periodon* 15 : 297-303, 1983.
 32. Genco RJ.: Antinotics in the treatment of human perodon disease. *J P eriodon* 52 : 545-558, 1981.
 33. Assoian PK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB.: TGF- β in human platelets. *J Biol Chem* 258 : 7155-7160, 1983.
 34. Frolick CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Spron MB.: Purification and initial characterization of TGF- β form human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 3676-3680, 1983.
 35. Roberts AB, Anzano MA, Meyers CA, et al.: Purification and properties of a type TGF- β from bovine kidney. *Biochem* 22 : 5692-5698, 1983.
 36. 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.
 37. Sporn MB, Roberts AB, Wadefield LM, de Crombrugge B.: Some recent advances in the chemistry and biology of TGF- β . *J Cell Biol* 105 : 1039-1045, 1987.
 38. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH.: Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by TGF- β . *J Exp Med* 165 : 251-256, 1987.
 39. Ignotrz R, Massgugue I.: TGF- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol Chem* 261 : 4337-4345, 1986.
 40. Antosz ME, Bellows Cg, Aubin JE.: Effects of TGF- β and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone noudules in isolated fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 140 : 386-393, 1989.
 41. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E.:

- TGF- β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262 : 2874-2896, 1987.
42. Centrella M, Massague J, Canalis E.: Human platelet-derived TGF- β stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 119 : 2306-2312, 1986.
 43. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL.: Mitogenic effect of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodon* 65 : 142-148, 1993.
 44. Narayanan AS, Nakae H, Miki Y.: Biology of the gingiva: The connective tissue in health and disease and molecular aspects of periodontal regeneration and reattachment. Recent Advances and molecular aspects of periodontal regeneration and reattachment. Recent Advances in Clinical Periodontology. Elsevier Science Publishers 51-61, 1988.
 45. Boko GA, Melcher AH, Brunette DM.: Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. *J Periodont Res* 16 : 73-88, 1981.
 46. Melcher AH. : Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol* 15 : 1183-1204, 1970
 47. 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.
 48. 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.
 49. Sodex J, Berkman FA.: Bone cell cultures. In : *Methods in Enzymology*, Academic Press. 145 : 303-324, 1987.
 50. 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
 51. Topham RT, Cielo DJ. Jr, Cattone VH, Hiuton DA, Klein RM.: The effects of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dev Biol* 124 : 532-543, 1987.
 52. Yamashita Y, Sato M, Noguchi T.: Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch Oral Biol* 32 : 673-678, 1987.
 53. Wikesjo ME, Baker PJ, Christersson LA, Genco PJ, Raymond SH, Diflorio RM, Terranova VP.: A biochemical approach to periodontal regeneration. Tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodont Res* 21 : 322-329, 1986.
 54. Goodson JM, Holborow D, Dum RL, et al.: Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. *J Periodont* 54 : 1983, 1983.
 55. Goodson JM, Offenbacher S, Farr DH, et al.: Periodontal disease treatment by local drug delivery. *J Periodontol* 56 : 265-272, 1985.
 56. Klebe RJ. : Isolation of a collagen-

dependent cell attachment factor. Nature
250 : 248-251, 1974.
57. Piche JE, Carnes DL, Graces DT.: Initial

characterization of cells derived from
human periodontia. J Dent Res 68 :
761-767, 1989.

Effects Of Minocycline And TGF - β 1 On Human Gingival Fibroblasts And Periodontal Ligament Cells In Vitro

Dong - Hwan Yoon, Hyung - Keun You, Hyung - Shik Shin
Dept. of peridontology, College of Dentistry, Wonkwang University

One of the initial events required for periodontal regeneration is the attachment, spreading and proliferation of fibroblasts at the healing sites. These have been reported that minocycline stimulates the attachment of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells and TGF - β 1 enhances the proliferation of periodontal ligament cells. The purpose of this study was to evaluate and confirm the effect of minocycline and TGF - β 1 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells.

That gingival fibroblasts and periodontal ligament cells used in this study were obtained from the explants of healthy periodontal ligaments and gingival tissues of extracted 3rd molars or premolar teeth extracted from the patients with orthodontic treatment. The cells were cultured in α - MEM (minimal essential medium) supplemented with antibiotics and FBS (fetal bovine serum) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide - 95% air. Cells were used between the 5th to 8th passage in this study. The attachment and activity of both cells were evaluated by MTT assay.

The results were as follows:

1. Maximum gingival fibroblast attachment was seen at a 50 μ g/ml dose of minocycline, while maximum periodontal ligament cell attachment was seen at a 100 μ g/ml, and exposure of both cells to minocycline above maximal attachment dose results in a decline from maximum attachment.
2. The activity values of both cells tested minocycline were below to the control activity values at all concentrations.
3. The attachment values of both cells tested TGF - β 1 were below or similar to control attachment values.

On the above the findings, minocycline stimulated the cell attachment of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells and TGF - β 1 enhances the cell activity of periodontal ligament cells.