

# PDGF와 IGF - I 병용 사용시 치주인대세포의 증식과 세포활성에 미치는 영향에 관한 연구

서조영<sup>1</sup> · 신희인<sup>2</sup> · 경희문<sup>3</sup>

경북대학교 치과대학 치주과학교실<sup>1</sup>  
구강병리학교실<sup>2</sup>, 교정학교실<sup>3</sup>

## I. 서론

치주조직은 세포구성성분, 각 세포의 활성화도, 세포외 기질을 구성하는 단백질의 형태와 양, 질환에 대한 민감도가 각기 다른 4 가지 조직으로 구성되어 있다. 즉, 석회화된 조직인 백악질과 치조골에 섬유성인 치주인대가 삽입되어 치아를 지지하고 이들 조직을 치은이 덮으므로 하방지지조직을 보호하고 있다. 그러므로, 파괴된 치주조직의 치유양상에 관여하는 조직들은 치은상피, 치은결체조직, 치조골과 치주인대가 있으며, 이중 치주인대에서 유래된 세포가 치유부위에 가장 먼저 도달시 치주질환에 이환된 치근면에 교원질 섬유가 삽입된 신생 백악질의 형성이 관찰되므로 치주인대세포가 치주조직의 재생에 중요한 역할을 할 것이라고 보고<sup>1, 2)</sup>되었다.

치주인대는 0.25mm 정도의 폭으로 치근부를 둘러싸고 있는 조직으로서 collagen, glycoprotein, proteoglycans 등으로 구성된 세포외 기질내에 산재해 있는 많은 세포들을 함유하고 있다. 치주인대내의 세포들로는 섬유아세포, 조골세포, 백악아세포, 파골세포, 상피

세포, 혈관내피세포 등 잘 분화된 세포들과 미분화된 증배엽세포들이 있다. 미분화된 증배엽세포들은 혈관주위에서 느리게 증식하며<sup>3-6)</sup>, 어떠한 조건이 주어지면 치주조직재생에 관여하는 결체조직세포로 분화할 수 있는 복합기능을 가진 세포로 알려져 있다<sup>7, 8)</sup>.

최근의 연구는 세포와 그들의 세포외기질 사이의 특수한 상호작용이 성장과 형태, 그리고 기능에 있어서 중요하다고 제시한 바 있다<sup>9)</sup>. 이들 분자들은 조직들을 결합시키는데 세포에 중요한 영향을 주고 서로 다른 세포와 조직의 작용을 조절할 수 있다. 치주조직의 창상의 치유는 구조적으로나 기능적으로 손상된 조직에 세포적 또는 분자적인 일련의 사건들의 유기적 과정의 결과인데, 손상의 치유는 조직결손이 일어나면서 바로 시작되며 이때 손상받은 세포와 염증세포로부터 폴리펩타이드계 성장인자(Polypeptide Growth Factor)의 분비가 이러한 과정에서 매우 중요한 부분을 차지한다<sup>10)</sup>고 알려져 있다. 이는 Terranova와 Wikesjo<sup>11)</sup>가 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자에 의해 조절되며 폴리펩타

이 논문은 경북대학교 병원 임상의학 연구소 연구비 지원에 의해 이루어짐

이드계 성장인자가 치주조직 재생에 중요한 역할을 한다고 시사한 바에서도 알 수 있다. 폴리펩타이드계 성장인자는 구조와 기능에서 호르몬과 유사하지만 합성되는 장소나 특이표적세포에 이동하는 수단이 더 다양한 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>.

이들 폴리펩타이드계 성장인자중 치주치료에 있어서의 재생을 조절하는 성장인자로서 최근에 혈소판유래성장인자(Platelet-Derived Growth Factor, 이하 PDGF라 표기)와 인슐린 유사성장인자-I(Insulin-like Growth Factor-I, 이하 IGF-I이라 표기)이 많이 연구되어지고 있다. PDGF는 1974년 발견되어 중배엽의 세포 즉 섬유아세포, 신경세포, 평활근세포, 골세포를 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며<sup>13~16)</sup> 9.8의 등전점과 30kDa의 분자량을 가지고 있는 조절성 단백질로서<sup>19~20)</sup> 단종이량체(PDGF-AA, BB)와 이중이량체(PDGF-AB)로 존재함이 발견되었으며 세포막에는  $\alpha$ ,  $\beta$ 형 두 가지 형태의 PDGF 수용기가 있는 것<sup>21)</sup>으로 알려져 있다. PDGF의 유리되는 근원은 혈소판의  $\alpha$ -granule로 보고된 바 있으며<sup>22)</sup> 혈소판 이외에 단핵세포 및 대식세포<sup>23)</sup>, 섬유아세포<sup>24)</sup>, 내피세포<sup>25)</sup>, 골기질<sup>26)</sup>등으로부터 분리된다고 밝혀졌으며 중성구, 단핵세포, 그리고 섬유아세포에 대해 화학주성이 있고<sup>27, 28)</sup> 상처부위의 창상치유에 중요한 역할을 하는 이러한 세포들을 자극하여 fibronectin, collagenase 그리고 다른 성장인자들의 합성을 유도한다고 알려져 있다<sup>29~32)</sup>.

IGFs는 proinsulin과 49% DNA 서열상동성을 가지고 있는 단일체 단백질<sup>33~35)</sup>로서 간에서 생성되어 20~80nM 농도로 혈장에 존재하여 호르몬과 같이 전신적 조절물질로 작용하거나 골조직을 포함한 다른 여러 조직에서 생성, 분화되어 국소적으로 작용하며, IGF-I과 IGF-II 두 종류가 있다<sup>36, 37)</sup>. IGF-I은 8.4 등전점과 7649 Da의 분자량을 가지며 70개의 아미노산으로 구성되어 있고<sup>33)</sup>, IGF-II는 분자량이

7471 Da이며 67개의 아미노산으로 구성되어 있으며<sup>34)</sup>, 서로 62% DNA 서열상동성을 가지면서<sup>38)</sup> 각각 다른 수용기와 반응하는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 또한 IGF는 somatomedins으로 알려져 있는데 이는 성장 호르몬의 영향을 받기 때문이며 somatomedin C는 IGF- I 과 동일 물질임이 밝혀졌다<sup>40~44)</sup>. IGF- I 은 골세포의 증식, 교원질합성 및 기질침착을 촉진시키는 것으로 알려져 있다<sup>45)</sup>.

창상부위에서 여러 가지 성장인자들이 분비되어 상호작용하여 치유과정에서 조절체능력을 제공하는데, PDGF와 IGF- I 의 결체조직 치유과정에서의 각각의 역할과 중요성이 활발히 연구되어 오면서 이들의 상호작용에 대해서도 많은 연구가 이루어지고 있다. Lynch 등<sup>45, 47)</sup>은 돼지의 피부 창상부위에 PDGF적용시 적용농도에 따라 신생결체조직과 내피층의 두께가 증가됨을 관찰할 수 있었고, IGF- I 과 함께 투여시 PDGF 단독투여보다 더 많은 양의 신생결체조직이 형성됨을 보고하였으며, 이런 연구들을 바탕으로 Lynch 등<sup>48~50)</sup>은 자연적으로 발생한 치주염에 의해 파괴된 치주병소와 임프란트 주위에 PDGF와 IGF- I 을 병용투여시 상당한 양의 신생 치조골과 신생 백악질을 관찰할 수 있었다고 보고하였고, Rutherford 등<sup>51)</sup>은 원숭이에서 실험적으로 야기된 치주염의 치료방법으로 PDGF와 IGF- I 병용투여시 상실된 치주조직의 약 50%정도가 재생됨을 관찰하였다고 보고하였으며, Giannobile 등<sup>52)</sup>은 개와 사람 이외의 영장류에 PDGF와 IGF- I 병용사용시 각각 51.4%와 64.1%의 신생백악질 형성과 65%와 21.6%의 치조골형성을 관찰할 수 있었다고 보고하였다.

이와 함께 시험관적 실험으로서는 Canalis<sup>53)</sup>에 의하면 배양된 쥐의 두개관 세포에 PDGF 적용시 DNA 합성을 증가시키고 단백질 합성에는 비특이성 자극효과가 있다고 보고하였으며, Canalis<sup>54)</sup>는 쥐의 두개관 조직배양에 IGF-

I 을 투여하여 DNA 합성을 측정해 본 결과 0.1-100nM의 농도에서 대조군에 대해 DNA 합성과 교원질, 비교원성 단백질, 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다고 보고하였다. Stiles 등<sup>55)</sup>은 섬유아세포에 PDGF와 somatomedin-C(IGF-I) 투여시 세포의 증식능이 상승됨을 보고하였고 Clemmons와 Van Wyck<sup>56)</sup>는 somatomedin-C(IGF-I)은 PDGF에 의한 섬유아세포 증식에 progression factor로 작용함을 보고하였고, Rutherford 등<sup>57)</sup>은 사람 치주인대 세포에 농도별로 PDGF와 IGF-I 병용투여해 본 결과 세포증식능은 증가하였으나 교원질 합성에는 유의한 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다. Matsuda 등<sup>58)</sup>은 배양된 쥐의 치주인대세포에 PDGF와 IGF-I 병용투여시 세포의 증식능이 크게 증가됨을 보고하였고, Blom 등<sup>59)</sup>은 쥐의 치주인대세포의 세포막에 IGF-I 수용체가 많이 존재함을 보고하였다.

이상의 연구들을 살펴본 결과 중배엽세포의 조절인자인 PDGF와 IGF-I이 생체실험에서 치주조직재생에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었으며 이에 저자는 치주조직재생에 중요한 역할을 하는 치주인대세포를 배양하고 이들 두 성장인자를 다양한 농도별로 병용투여하여 세포의 증식능, 단백질 및 교원질 합성능을 측정해 봄으로써, IGF-I이 치주인대세포의 증식과 활성화에 대한 PDGF 효과를 상승시킬 수 있는지와 두 성장인자의 농도에 따른 효과를 알아보기 위하여 이 연구를 실시하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 재료(시약)

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 DMEM로 표기)을 사용하였고, fetal bovine serum (Gibco사, 미국, 이

하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그 외 trypsin, bovine serum albumin (이하 BSA로 표기), ascorbic acid, dimethyl sulfoxide, highly purified bacterial collagenase type VII, sodium parantirophenyl-2-phosphate, parantirophenol, nonident F-40(이상 Sigma사, 미국)등을 사용하였다. 그리고 [methyl-3H] thymidine(6.7 Ci/mmol)(New England Nuclear사, 미국), L-[5-3H] proline(12.4 Ci/mmol)(New England Nuclear사, 미국), 유전자 재조합형 PDGF-BB, IGF-I(Genzyme사, 미국)를 사용하였다.

### 2. 치주인대세포의 세포배양

교정치료를 목적으로 경북대학교병원에 내원한 환자의 발거될 제일소구치를 해당부위로 하고 초기배양과정에서 야기될 수 있는 세균 감염을 예방하고자 통상의 배양액에 포함되는 항생제 용량의 2배인 200U/ml penicillin (근화 제약, 한국)과 200 $\mu$ /ml streptomycin (동아 제약, 한국)이 첨가된 DMEM을 생검배지로 준비하였다. 조직처리과정에서 치은조직합입을 배제하고 치주인대조직만 채취하기 위하여 제일소구치부위에 내사면 절개를 가하고 치경부 1/3 부위를 소파한 후 제일소구치를 발거하여 생검배지에 침수시켰다. 발거한 치아를 생검배지로 3회 세척한 후 치근중간 1/3부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세척한 다음 35mm 배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고 37°C, 100%습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 치주인대 세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층밀생이 형성된 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였다. 이 실험에서 모든 세포들은 4세대에서 6세대 사이의 세포를 사용하

였다.

### 3. 치주인대세포 증식 및 DNA합성 측정

IGF-I과 PDGF-BB가 치주인대세포 증식에 미치는 영향은 [<sup>3</sup>H]thymidine이 DNA 내로 편재되는 속도로서 관찰하였다. 치주인대세포를  $1 \times 10^5$  cells/ml이 되게 24well culture plates(Corning사, 미국)에 넣고 3일간 배양하여 육안적인 밀생상태가 되게 하였다. 그 후 세포배양액을 제거한 세포층을 phosphate buffered saline(이하 PBS로 표기)으로 2번 세척 후 0.4% FBS이 든 DMEM으로 교체하여 24시간 동안 세포주기를 정지시킨 다음 0.1% FBS가 함유된 DMEM에 1, 10ng/ml PDGF-BB, 1ng/ml PDGF-BB와 10ng/ml IGF-I, 1ng/ml PDGF-BB와 100ng/ml IGF-I, 10ng/ml PDGF-BB와 10ng/ml IGF-I, 10ng/ml PDGF-BB와 100ng/ml IGF-I주입한 후  $1 \mu\text{Ci/ml}$  [<sup>3</sup>H]thymidine을 첨가한 군을 실험군으로 하고 IGF-I과 PDGF-BB를 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 24시간동안 배양하였다.

세포배양액을 제거하고 세포층을 PBS로 세척 후 5% trichloro-acetic acid(이하 TCA로 표기)를 1ml넣고 4°C에서 20분간 방치한다. 그후 5% TCA로 2회 세척하고 찬 ethanol 1ml를 넣어 씻고 실온에서 건조시킨다. DNA내로 편입되지 않은 방사능을 씻어 내고, 준비된 세포층에 500 $\mu\text{l}$ 의 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>가 든 0.1N NaOH를 넣어 세포를 완전히 녹인 후 5ml scintillation cocktail과 섞어 DNA로 편입된 방사능을  $\beta$ -counter로 측정하였다. 측정된 값은 CPM(counter per minute)으로 표기하였다.

### 4. 총단백질과 교원질합성능의 측정

치주인대세포를 각각 24well culture plates(Corning사, 미국)에 한 well당  $1 \times 10^5$ 세포를 접종한 후 10% FBS가 함유된 1ml DMEM에

서 밀생상태가 될 때까지 3일간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid와 0.1% FBS이 첨가된 DMEM으로 교환하고 1, 10ng/ml PDGF-BB, 1ng/ml PDGF-BB와 10ng/ml IGF-I, 1ng/ml PDGF-BB와 100ng/ml IGF-I, 10ng/ml PDGF-BB와 10ng/ml IGF-I, 10ng/ml PDGF-BB와 100ng/ml IGF-II를 주입한 후 2 $\mu\text{Ci}$  [<sup>3</sup>H]-proline를 첨가하여 24시간이 경과한 후 생성된 총 단백질과 교원질양을 Peterkofsky 와 Diegelmann<sup>60)</sup> 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. PDGF-BB, IGF-I- $\beta$ 1를 주입한 군을 실험군으로 하고 PDGF-BB, IGF-I를 주입하지 않은 군을 대조군으로 하였다.

각 well에 5 x collagenase buffer(0.25M Tris, 0.025M CaCl<sub>2</sub>와 0.0125M N-ethylmaleimide 함유, PH7.4)를 250 $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 24 well culture plates를 얼음위에 놓고 30초간 초음파 분쇄기로 세포막을 파괴시킨 후 1ml씩 취하여 microfuge tube에 넣고 50% trichloroacetic acid(이하 TCA로 표기)/5mM proline 300 $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 잘 혼합하여 0°C 에서 5분간 방치한 후 1000 x g에서 5분간 원침하여 상층액을 버리고 5% TCA/1mM proline으로 3회 세척한 후 침전물을 0.2N NaOH에 용해시킨 후 1M HEPES buffer(PH7.2)를 첨가하여 중화시킨 후 5x collagenase buffer 100 $\mu\text{l}$ 를 첨가하였다.

microfuge tube에 각 용액을 반으로 나누어 넣은 후 교원질 합성양을 측정하기 위한 microfuge tube에 15U collagenase가 함유된 collagenase buffer를 15 $\mu\text{l}$  주입하고 총단백질 합성양을 측정하기 위한 microfuge tube에는 15U collagenase가 함유되지 않는 collagenase buffer를 15 $\mu\text{l}$  주입하여 37°C에서 90분간 배양한 다음 collagenase활성을 정지시키기 위해 0°C로 냉각시키고 각 tube에 50% TCA/2.5% tannic acid를 첨가하여 4°C 에서 30분간 방치하였다.

교원질 합성양을 측정하기 위해서는

$$\text{percent of collagen} = \frac{\text{dpm in collagen} \times 100}{(\text{dpm in noncollagenous protein}) \times 5.4 + \text{dpm in collagen}}$$

\* dpm : disintegration per minute

collagenase가 함유된 microfuge tube를 1000 x g에서 5분간 원침 후 상층액과 5% TCA/1mM proline으로 세척한 세척액을 counting vial에 담아 10ml scintillation cocktail을 넣어 liquid scintillation counter(Packard사, 미국)로 5분간 방사능을 측정하였다.

총단백질량을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유되지 않은 microfuge tube를 1000 xg에서 5분간 원침 후 상층액을 버리고 5% TCA/1mM proline으로 세척 후 침전물을 0.2N NaOH용액으로 용해시켜 counting vial에 담아 상기의 방법으로 방사능을 측정하였다. 단백질 합성에 대한 교원질합성의 상대적 비율은 위의 공식에 의거하여 계산하였다<sup>61)</sup>.

비교원성 단백질량은 총 단백질 양에서 교원질량을 공제하므로써 산출하였다.

### III. 결 과

#### 1. 치주인대세포의 DNA 합성능에 대한 효과

치주인대세포에 IGF-I과 PDGF-BB를 병용 투여하였을 때 DNA 합성능의 효과는 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군과 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군을 제외하고 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 통계학적으로 유의한 차이(P<0.05, P<0.01)를 나타내었다. 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군에서 증가 양상이 높았고 PDGF-BB 단독투여군보다 IGF-I 병용투여군에서 DNA 합성능이 증가된 양상을 나타내었으며, 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 단독투여군에 비해 IGF-I 병용투여군에서 통계학적으로 유의한

차이(P<0.05, P<0.01)를 나타내었으나, 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 단독투여군에 비해 IGF-I 병용 투여군에서 통계학적 유의성이 없었다(P>0.05, 그림 1)

#### 2. 치주인대세포의 총단백질 합성양에 대한 효과

치주인대세포에 IGF-I과 PDGF-BB를 동시에 주입하였을 때 총단백질 합성량의 효과는 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 증가된 양상을 보였으며 통계학적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다. 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군에서 증가 양상이 더 높게 나타났으며, PDGF-BB 단독 투여군보다 IGF-I 병용 투여군에서 총단백질 합성량이 증가된 양상을 나타내었으며, 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 단독투여군에 비해 IGF-I 병용 투여군에서 통계학적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었으나, 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 단독투여군에 비해 IGF-I 병용 투여군에서 통계학적 유의성이 없었다(P>0.05, 그림 2)

#### 3. 치주인대세포의 교원질과 비교원성 단백질 합성능에 대한 효과

1ng/ml PDGF-BB 단독투여군을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 교원질 합성능이 증가하는 경향을 나타내었으며 통계학적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다. 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군보다 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군에서 교원질 합성능이 더 높게 나타났으며 PDGF-BB 단독 투여군보다 IGF-

I 병용 투여군에서 교원질 합성능이 증가된 양상을 나타내었다. 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 단독투여군에 비해 IGF-I 병용투여군에서 통계학적으로 유의한 차이( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )를 나타내었고 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서 가장 높게 나타났으며 그 합성능은 10ng/ml IGF-I과 10ng/ml PDGF-BB, 100ng/ml IGF-I과 10ng/ml PDGF-BB 투여군의 합성능과 유사하였다(그림 3).

비교원성단백질의 합성능은 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군과 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군을 제외하고 통계학적으로 유의한 차이( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )를 나

타내었다. 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군보다 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군에서는 더 높게 나타났으며 PDGF-BB 단독투여군보다 IGF-I 병용 투여군에서 비교원성 단백질 합성능이 증가된 양상을 나타내었으나 통계학적으로 유의는 없었다( $P > 0.05$ , 그림 4).

총단백질에 대한 교원질 합성의 상대적 비율은 대조군에 비해 미약하게 증가된 양상을 보였으며 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서 가장 높게 나타났으며 PDGF-BB 단독투여군에 비해 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군, 10ng/ml IGF-I과 10ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서 통계학적 유의성( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )이 있었다(그림 5).

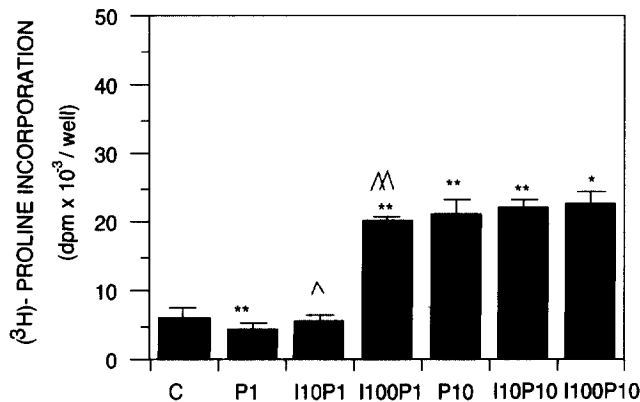


그림 1. The effect of IGF-I and PDGF-BB in combination on DNA synthetic activity in human periodontal ligament cells. Twenty four-well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After incubation for 3 days, the medium was replaced with Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 0.4% fetal bovine serum. IGF-I and PDGF-BB were added to the quiescent cells.  $^3\text{H}$ -thymidine were labeled for the last 24h of culture. The values are expressed as mean and S.D. of three determination. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDGF, I10 : 10ng/ml IGF-I, I100 : 100ng/ml IGF-I.

\* : significantly different from control value( $p < 0.05$ )

\*\* : significantly different from control value( $p < 0.01$ )

^ : significantly different from P1 group( $p < 0.05$ )

^^ : significantly different from P1 group( $p < 0.01$ )

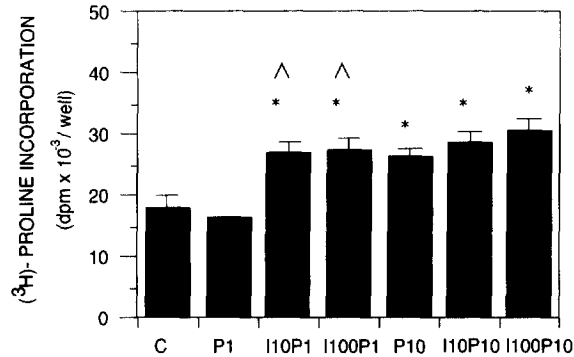


그림 2. The effect of IGF-I and PDGF-BB in combination on total protein synthesis in human periodontal ligament cells. Twenty four-well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbeccos's modified Eagle medium containing 0.1% fetal bovine serum, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid and 2 $\mu$ Ci[<sup>3</sup>H] proline and the indicated amounts of IGF-I and PDGF-BB combined incubation was added. Total protein synthesis were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinations. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDGF, I10 : 10ng/ml IGF-I, I100 : 100ng/ml IGF-I.

\* : significantly different from control value( $p < 0.05$ )

^ : significantly different from group P 1( $p < 0.05$ )

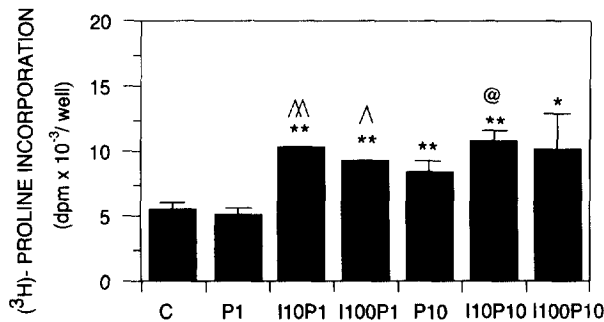


그림 3. The effect of IGF-I and PDGF-BB in combination on collagen synthesis in human periodontal ligament cells. Twenty four-well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbeccos's modified Eagle medium containing 0.1% fetal bovine serum, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid and 2 $\mu$ Ci[<sup>3</sup>H] proline and the indicated amounts of IGF-I and PDGF-BB combined incubation was added. Collagenous, noncollagenous protein synthesis, percent of collagen were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinations. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDFG, I710 : 10ng/ml IGF-I, I100 : 100ng/ml IGF-I.

\* : significantly different from control value( $p < 0.05$ )

\*\* : significantly different from control value( $p < 0.01$ )

^ : significantly different from P1 group( $p < 0.05$ )

^^ : significantly different from P1 group( $p < 0.01$ )

@ : significantly different from P10 group( $p < 0.05$ )

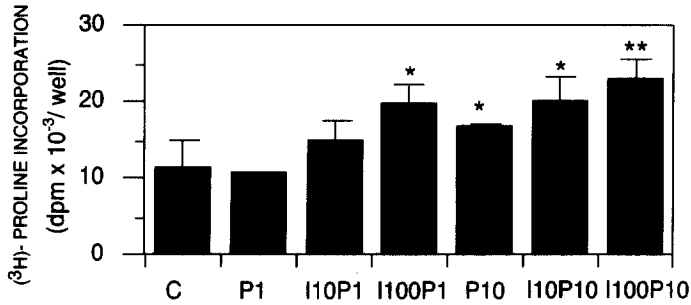


그림 4. The effect of IGF-I and PDGF-BB in combination on noncollagenous protein synthesis in human periodontal ligament cells. Twenty four-well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbeccos's modified Eagle medium containing 0.1% fetal bovine serum, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid and 2 $\mu$ Ci[<sup>3</sup>H] proline and the indicated amounts of IGF-I and PDGF-BB combined incubation was added. Collagenous, noncollagenous protein synthesis, percent of collagen were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinations. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDFG, I10 : 10ng/ml IGF-I, I100 : 100ng/ml IGF-I.

\* : significantly different from control value( $p < 0.05$ )

\*\* : significantly different from control value( $p < 0.01$ )

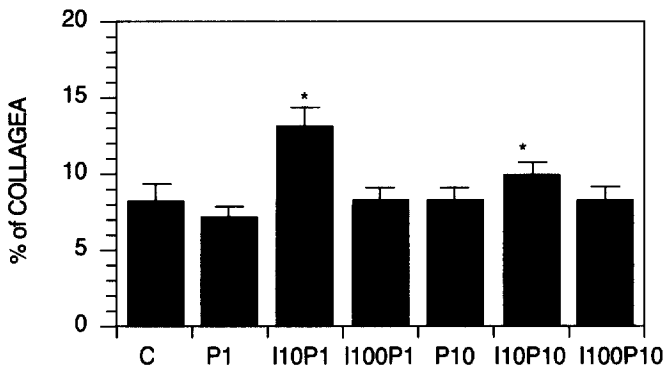


그림 5. The effect of IGF-I and PDGF-BB in combination on percent ofcollagen in human periodontal ligament cells. Twenty four-well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbeccos's modified Eagle medium containing 0.1% fetal bovine serum, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid and 2 $\mu$ Ci[<sup>3</sup>H] proline and the indicated amounts of IGF-I and PDGF-BB combined incubation was added. Collagenous, noncollagenous protein synthesis, percent of collagen were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinations. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDFG, I10 : 10ng/ml IGF-I, I100 : 100ng/ml IGF-I. \* : significantly different from control value( $p < 0.05$ )



#### IV. 총괄 및 고안

치주치료 후 이상적인 치유는 치주인대에서 기원하는 세포가 증식하여 이전의 병소치근면을 덮음으로써 치유될 수 있다고 알려져 있다. 치주조직의 잠재재생능력에 관한 연구들<sup>1), 2)</sup>에서 교원섬유가 삽입된 새로운 백악질이 치주창상의 가장 근단부 쪽에서 침착된다는 것이 알려졌다. 이는 새로운 부착능력이 있는 치주인대에서 온 세포들이 치근면을 따라 치근부 쪽으로 이동하는 능력이 있음을 시사한다. 그러나 이런 치주인대세포의 능력은 상피와 치은결체조직이 배제될 때에만 생길 수 있으므로 치주창상내로 결합조직 부착을 재생시킬 수 있는 특정 세포를 유도하는 술식과 그 재생 과정에 관한 많은 연구가 행해지고 있다. 이러한 세포의 이주와 활성화에는 또한 성장인자에 의해서도 조금 영향을 받는데, 성장인자로서 PDGF, 변형성장인자, 인슐린유사성장인자, 상피성장인자 등이 알려져 있으며 이에 관한 연구가 이루어지고 있다. 다양한 성장인자의 합성과 분비가 조절되는 생화학체계는 알려져 있지 않지만 성장인자에 유도되는 증식반응의 신호전달은 표적세포면에 있는 높은 친화성의 수용기에 의해 조절되는 것으로 믿어진다.

IGFs는 proinsulin과 49% DNA 서열상동성을 가지고 있는 단일쇄 단백질로서 IGF-I과 IGF-II 두 종류가 있다<sup>33-35)</sup>. 이 중 IGF-I은 8.4 등전점과 7649 Da의 분자량을 가지며 70개의 아미노산으로 구성되어 있고<sup>36)</sup>, IGF-II와 서로 62% DNA 서열상동성을 가지면서<sup>38)</sup> 골세포에 대해 IGF-II 보다 다소 강한 생물학적 활성도를 나타내며 각각 다른 수용기와 반응하는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 또한 전신적으로 작용하는 IGF-I은 간에서 생성되어 성장 호르몬의 조절을 받고 국소적으로 생성된 IGF-I은 여러 가지 호르몬과 다른 성장인자들에 의해 조절 받는 것으로 알려져 있다<sup>36), 37)</sup>.

PDGF는 30kDa의 분자량을 가지는 조절성 단백질로서 단중이량체와 이중이량체로 존재하며 세포막에는 두 가지 형태의 PDGF 수용기가 있으며,  $\alpha$ 형 수용기는 PDGF-AA, AB 그리고 BB에 대해 높은 친화력으로 결합하는 반면  $\beta$ 형 수용기는 PDGF-BB에 높은 친화력이 있고 PDGF-AB에는 친화력이 낮으며 PDGF-AA는 결합하지 않는다고 알려져 있다<sup>21)</sup>. Nister 등<sup>42)</sup>과 Kazlanskus 등<sup>43)</sup>은 PDGF-BB, AB는 동등한 활성도를 가지고 있으며 사람의 섬유아세포에서 DNA 합성을 자극하는 동일한 강도를 가지고 있으나 PDGF-AA는 세포유사분열에 대한 활성도가 다른 두 개의 isoform과 비교시 약하게 나타난다고 보고하였다. Ramakrishnan과 Cho<sup>44)</sup>은 쥐의 치주인대세포에 대한 PDGF의 수용기를 동정해 낸 실험에서 쥐의 치주인대세포에는 세포의 화학주성과 증식에 중요한 역할을 하는  $\beta$  형태의 PDGF의 수용기가 존재함을 보고하였고, Oates 등<sup>45)</sup>은 사람의 치주인대세포에 PDGF-AA, BB를 주입해서 세포의 증식을 알아본 실험에서 PDGF-AA, BB 모두 DNA 합성을 증가시킴을 보임으로써 사람의 치주인대세포에는  $\alpha$ 와  $\beta$ 의 수용기가 존재할 것이라고 시사하였다. Matsuda 등<sup>48)</sup>은 PDGF-BB가 PDGF-AB보다 낮은 농도에서 세포증식능과 화학주성의 효과에 가장 큰 영향을 주었다고 하였으며, 이러한 관찰은 치주인대 섬유아세포가 PDGF의  $\beta$ 형 수용기를 많이 가졌다는 것을 시사한다고 하였다. 따라서, 이상의 연구들을 근거로 하여 IGF-I과 PDGF-BB를 본 실험의 연구재료로 사용하였다.

각 성장인자의 농도 설정에 있어서 PDGF-BB는 쥐의 두개관조직배양에 0.2, 0.6, 2, 6, 20, 60, 200ng/ml의 PDGF를 투여시 0.6~200ng/ml의 농도에서 대조군에 비해 DNA 합성능이 증가하였으며 60ng/ml 보다 200ng/ml 투여군에서 약간 감소하는 경향을 보인다는 Canalis<sup>53)</sup>의 연구, 쥐의 치주인대세포에 0.1, 1,

10ng/ml의 PDGF-BB를 투여해 본 결과 농도가 증가할수록 DNA 합성능이 증가하였으며 0.1ng/ml 투여시 보다 10ng/ml 투여시 3배 정도 증가하였다는 Matsuda 등<sup>58)</sup>의 연구, 사람의 치주인대세포에 0.1, 1, 10, 100ng/ml 주입시 10ng/ml까지 DNA 합성능이 증가함을 보고한 오 등<sup>66)</sup>의 논문을 근거로하여 1, 10ng/ml 농도를 본 실험에 사용하였다. IGF-I는 조골세포에 1, 10, 100ng/ml 투여시 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가하였다는 Wergedal 등<sup>67)</sup>의 보고, 쥐의 치주인대세포에 IGF-I 0.1, 1, 10, 100, 1000ng/ml 주입시 100ng/ml 이상의 농도에서 단백질 합성능이 증가하였다는 Matsuda 등<sup>58)</sup>의 보고, 사람의 치주인대세포에 0.1, 1, 10, 100ng/ml 주입시 10, 100ng/ml에서 DNA 합성능과 교원질 합성능이 유의성 있게 증가하였다는 김 등<sup>68)</sup>의 논문을 근거로 하여 10, 100ng/ml 농도를 본 실험에 사용하였다.

이 연구에서 치주인대세포의 DNA 합성능에 대한 효과를 알아본 실험의 결과로는 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군과 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군을 제외하고 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 통계학적으로 유의한 차이 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )를 나타내었으며 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군에서 증가 양상이 높았다. 이는 Canalis 등<sup>53)</sup>의 쥐 두개관 조직배양시 결과와 Matsuda 등<sup>56)</sup>의 쥐의 치주인대세포, Oates 등<sup>65)</sup>, 오 등<sup>66)</sup>의 사람 치주인대세포에서 나타난 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한 PDGF-BB 단독투여군보다 IGF-I 병용투여군에서 DNA 합성능이 증가된 양상을 나타내었다는 결과는 Stiles 등<sup>55)</sup>, Clemmons와 Van Wyck<sup>56)</sup>, Rutherford 등<sup>57)</sup>, Matsuda 등<sup>58)</sup>의 연구결과와 유사하였다.

총단백질, 교원질, 비교원성 단백질의 합성능도 PDGF-BB 단독 투여군에서 10ng/ml PDGF-BB를 투여함으로써 대조군에 비해 통

계적으로 유의성 있는 증가를 보였으며 이는 Canalis 등<sup>53)</sup>과 오 등<sup>66)</sup>의 연구결과와 거의 일치하였다.

또한 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서 PDGF-BB 단독투여군보다 IGF-I 병용투여군에서 총단백질과 교원질 합성능이 통계학적으로 유의한 증가 양상을 나타내었는데 이는 사람의 치주인대세포와 치수세포에서 두 성장인자의 병용투여시 교원질 합성능의 유의한 증가를 보이지 않았다고 보고한 Rutherford 등<sup>57)</sup>의 연구결과와는 상이하였다. 이는 투여된 PDGF-BB와 IGF-I의 농도 차이로 생각되며 Rutherford 등의 연구에서는 두 성장인자 모두 동일한 양인 10ng/ml 병용투여와 1ug/ml 병용투여로 실험하였다. 이 연구에서도 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 PDGF-BB 단독투여군에 비해 IGF-I 병용투여군에서 총단백질과 교원질 합성능이 통계학적으로 유의한 증가 양상을 나타내지 않았다. 그리고 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서 최대치를 나타내었다. 이 결과들로 미루어 보아 PDGF-BB 저농도 투여시 IGF-I과 PDGF-BB를 병용투여함으로써 총단백질과 교원질 합성능이 증가될 것으로 사료된다.

이 연구에서 PDGF-BB 단독투여군에 비해 IGF-I과 PDGF-BB 병용투여군에서 DNA 합성능, 총단백질 및 교원질 합성능이 증가됨을 관찰할 수 있었는데 이는 치주인대세포에는 세포막에 IGF-I 수용체가 많이 존재하여 IGF-I 투여시 세포막에 있는 IGF-I 수용체와 결합함으로써 수용체의 tyrosin kinase를 자극하여 여러 가지 세포반응을 일으킬 수 있는 신호를 전달하는 것<sup>59)</sup>으로 생각되며, PDGF-BB는 IGF-I의 합성과 더불어 IGF-I 수용체 발현을 증가시키고<sup>69, 70)</sup>, IGF-I은 PDGF-BB에 노출된 휴지기 상태의 섬유아세포에서 세포들의 'S phase'로의 빠른 전환을 유도함으로써 PDGF-BB에 대한 progression factor로 작용<sup>56)</sup>

하여 PDGF-BB의 반응을 상승시킬 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 치주인대세포에서 IGF-I과 PDGF-BB는 상호 서로의 기능을 조절할 수 있는 능력을 가지고 있으므로 병용투여시 DNA 합성능, 총단백질 및 교원질 합성능에 대해 상승 효과가 있었으며, 두 성장인자의 상호 작용은 고농도의 PDGF-BB보다는 저농도의 PDGF-BB에서 더 의의가 있는 것을 알 수 있었다. 이러한 성질을 잘 파악하여 두 성장인자를 상실된 치주조직의 재생을 위하여 치유부에 주입시 치주치치 후 치주조직재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료되며, 치주인대세포에서 두 성장인자의 상호작용에 대한 기전을 규명하는 연구가 부가적으로 시행이 된다면 치주조직재생을 위한 병용적용에 보다 더 기여하게 될 것으로 사료된다.

## V. 결론

이 연구는 치주조직재생에 중요한 역할을 하는 치주인대세포를 배양하여 중배엽세포의 조절인자인 Platelet-derived growth factor-BB(이하 PDGF-BB라 표기)와 Insulin-like growth factor-I(이하 IGF-I이라 표기)을 병용투여하여 세포의 증식능, 단백질 및 교원질 합성능을 측정해 봄으로서, IGF-I이 치주인대세포의 증식과 활성화에 대한 PDGF 효과를 상승시킬 수 있는지와 두 성장인자의 농도에 따른 효과를 알아보기 위하여 이 연구를 실시하였다.

교정치료를 위해 내원한 환자로부터 건강한 제일소구치를 발거하여 치주인대세포를 분리, 배양하여 PDGF-BB와 IGF-I 주입시키지 않은 군을 대조군으로 하고, 1, 10ng/ml PDGF-BB와 10, 100ng/ml IGF-I를 단독 혹은 병용투여한 군을 실험군으로 정하여 DNA 합성능, 총단백질 및 교원질 합성능을 측정하여 다음

과 같은 결과를 얻었다.

치주인대세포에 IGF-I과 PDGF-BB를 병용투여하였을 때 DNA 합성능의 효과는 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군과 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군을 제외하고 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 통계학적으로 유의한 차이( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )를 나타내었다. 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군에서 증가양상이 높았고 PDGF-BB 단독투여군보다 IGF-I 병용투여군에서 DNA 합성능이 증가된 양상을 나타내었으며, 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 단독투여군에 비해 IGF-I 병용 투여군에서 통계학적으로 유의한 차이( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )를 나타내었다.

치주인대세포에 IGF-I과 PDGF-BB를 병용투여하였을 때 총단백질과 교원질 합성능의 효과는 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 증가된 양상을 보였으며 통계학적으로 유의한 차이( $P < 0.05$ )를 나타내었다. 또한 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군에서 증가 양상이 더 높게 나타났으며, PDGF-BB 단독 투여군보다 IGF-I 병용 투여군에서 총단백질과 교원질 합성능이 증가된 양상을 나타내었다. 총단백질과 교원질 합성능은 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 단독투여군에 비해 IGF-I 병용 투여군에서 통계학적으로 유의한 차이( $P < 0.05$ )를 나타내었다.

비교원성단백질의 합성능은 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 증가된 양상을 보였고, 1ng/ml PDGF-BB 단독투여군과 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군을 제외한 군에서 통계학적으로 유의한 차이( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )를 나타내었으며, PDGF-BB 단독 투여군보다 IGF-I 병용 투여군에서 비교원성 단백질 합성능이 증가된 양상을 나타내었으나 통계학적으로 유의는 없었다( $P > 0.05$ ).

총단백질에 대한 교원질 합성의 상대적 비율은 대조군에 비해 미약하게 증가된 양상을 보였으며 10ng/ml IGF-I과 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서 가장 높게 나타났다.

이상의 결과를 종합해보면 10ng/ml PDGF-BB는 치주인대세포의 DNA 합성능과 교원질 합성능을 증가시켰고, IGF-I을 병용투여함으로써 치주인대세포의 PDGF-BB에 대한 반응을 더욱 상승시킬 수 있었으며 이 효과는 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서 통계학적 유의성이 있었다.

### 참고문헌

1. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament : An experimental study in the monkey, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 257~265, 1982.
2. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 290~296, 1982.
3. Gould, T. R. L., Melcher, A. H. and Brunette, D. M. : Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding, *J. Periodont. Res.*, 15 : 20~42, 1980.
4. Gould, T. R. L. : Ultrastructural characteristics of progenitor cell populations in the periodontal ligament, *J. Dent. Res.*, 62 : 873~876, 1983.
5. McCulloch, C. A. G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice, *Anat. Rec.*, 211 : 258~262, 1985.
6. Davidson, L. and McCulloch, C. A. G. : Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations, *J. Periodont. Res.*, 21 : 414~428, 1986.
7. Aukhil, I., Simpson, D. M., Suggs, C. and Petterson, E. : In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. : An experimental study using physical barriers, *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 862~868, 1986.
8. Roberts, W. E. and Chase, D. C. : Kinetics of proliferation and migration associated with orthodontically-induced osteogenesis, *J. Dent. Res.*, 60 : 174~181, 1981.
9. Kleinman, H. K., Klebe, R. J. and Martin, G. R. : Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.*, 92 : 473-479, 1981.
10. Terranova, V. P., Nishimura, F., Price, R. M., Ye, J. : Polypeptide stimulation of periodontal regeneration, *Periodont. Case Rep.*, 13 : 6-12 1991.
11. Terranova, V. P., and Wikesj |, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium, *J. Periodontol.*, 58 : 371-380, 1987.
12. Graves, D. T. and Cochran, D. L. : Mesenchymal cell growth factors. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1 : 17-36, 1990.
13. Hintz, R. L. and Liu, J. : Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45 : 988 - 955, 1977.
14. Ross, R., Raines, E. W. and Bowen - Popo, f. : The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 46 : 155-169, 1986.
15. Stiles, C. D. : The molecular biology of platelet - derived growth factor, *Cell* , 33 : 653-659, 1983.
16. Kohler, N. and Lipton, A. : Platelet as a source of fibroblast growth promoting

- activity, *Exp. Cell Res*, 87 : 297-301 : 1974.
17. Antoniades, H. N. : Human platelet-derived growth factor(PDGF) : Purification of PDGF- I and PDGF- II and separation of their reduced subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78 : 7314-7317, 1981.
  18. Deuel, T. F., Huang, J. S., Proffitt, R. I., Baenzinger, J. U., Chang, D. and Kennedy, B. B. : Human platelet-derived growth factor purification and resolution into two active protein fractions, *J. Biol. Chem.*, 256 : 8896-8899, 1981.
  19. Heldin, C. H. , Backstrom, G. and Ostman, A. : Binding of different diametric forms of PDGF to human fibroblasts evidence for two separate receptor types, *EMBO J.*, 7 : 1387-1393 1988.
  20. Raines, E. W. and Ross, R. : Platelet-derived growth factor I. High yield purification and evidence for multiple forms, *J. Biol. Chem.*, 257 : 5154-5160, 1982.
  21. Williams, L. T. : Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science*, 243 : 1564-1570, 1987.
  22. Hawinger, J. : Platelet secretory pathway : an overview, *Method, Enzyme.*, 169: 191-195, 1989.
  23. Rappolee, D. A., Mark, D. and Banda, M. J. : Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo : Analysis of mRNA phenotyping, *Science.*, 241 : 707-712, 1988.
  24. Antoniades, H. N., Galanopoulos, T. and Neville-Golden, T. : Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor(PDGF) and PDGF receptor in RNA's in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts, *Proc. Natl. Aca. Sci, USA.*, 88 : 565-569, 1991.
  25. Sitarus, N. M., Sariban, E. and Pantagis, P. : 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, 1987.
  26. Hauschka, P. C., Mavrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E. and Klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix, *J. Biol. Chem.*, 261 : 12665-12674, 1986.
  27. Deuel, T. F., Senior, R. M., Huang, J. S. and Griffin, G. L. : Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor, *J. Clin. Inves.*, 69 : 1046-1049, 1982.
  28. Senior, R. M., Griffin, G. L. Hwang, J. S. Walz, D. A. and Deuel, T. F. : Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts. *J. Cell. Biol.*, 96 : 382-385, 1983.
  29. Tzeng, D. Y., Deuel, T. F., Hwang, J. S. and Baehner, R. L. : Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation on Blood, 66 : 179-183, 1985.
  30. Bauer, E. A., Cooper, T. W. Hwang, J. S. and Deuel, T. F. : Stimulation of in vitro human skin collagenase by platelet-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 : 4132-4136, 1985.
  31. Paulsson, Y., Hammacher, A., Heldin, C. H. and Westermark, B. : Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature*, 328 : 715-717, 1987.
  32. Blatti, S. P., Foster, D. N., Ranganathan,

- G., Moses, H. L. and Getz, M.J. : Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85 : 1119-1123, 1988.
33. Riderknecht, E. and Humbel, R. E. : The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin, *J. Biol. Chem.*, 253 : 2769-2776, 1978
34. Rinderknecht, E. and Humbel, R. E. : Primary structure of human insulin-like growth factor II, *FEBS Lett.*, 89 : 283-286, 1978.
35. Blundell, T. L., Bedarkar, S., Rinderknecht, E. and Humbel, R. E. : Insulin-like growth factor : A model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75 : 180-184, 1978
36. Canalis, E., Mc Carthy, T. and Centrella , M. : The role of growth factors in skeletal remodelling , *Endocrinol. Met. Clin. N. Am.*, 18 : 903-918, 1989
37. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : The regulative of bone formation by local factors, In *Bone and mineral research*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, (1989) pp 27-56.
38. Enberg, G., Carlquist. M. Jörnvall, H. & Hall, K. : The characterization of somatomedin A, isolated by microcomputer-controlled chromatography, reveals an apparent identity to insulin-like growth factor I, *Eur. J. Biochem.*, 143 :17-124, 1984.
39. Daughaday, W. H., Hall, K., Salmon, W. D. Jr, Van den Brande. J. L. & Van Wyk, J. J. : On the Nomenclature of the Somatomedins and Insulin-like growth factors, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65 : 1075-1076, 1987.
40. Rall, L. B., scot, J. and Bell, G. I. : Human insulin-like growth factor I and II messenger RMA : Isolation of complimentary DNA and analysis of expression, *Methods Enzymol.*, 146 : 239-243, 1987
41. Humbel, R. E. : Insulin-like growth factor, somatomedins and multiplication stimulating activity : chemistry, In *Hormonal proteins and peptides*, Li C. H., Ed., Academic press, New York, (1984) pp57-79.
42. Salmon, W. D. Jr & Daughaday, W. H. : A Hormonally controlled serum factor which stimulates surfate incorporation by cartilage in vitro, *J. Lab. Clin. Med.* 49 : 825-836, 1957.
43. Daughaday, W. H., hALL, k., Raben, M. S., Salmon, W. D. Jr. Van den Brande, J. L. & Van Wyk, J. J. : Somatomedin : Proposed designation for sulphation factor, *Nature*, 235 : 107, 1972.
44. Klapper, D. G., Svoboda, M. E. & Van Wyk, J. J. : Sequence analysis of somatomedin-C : Confirmation of identity with insulin-like growth factor I, *Endocrinology*, 112 : 2215-2217, 1983.
45. Hook, J. M., Centrella, M. and Canalis, E. : Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication, *Endocrinology* 122 : 254-260, 1988.
46. Lynch, S. E., Nixon, J. C., Colvin, R. V. and Antoniades, H. N. : Role of platelet-derived growth factor in wound healing :

- Synergistic effects with other growth factors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84 : 7696~7700, 1987.
47. Lynch, S. E., Colvin, R. B. and Antoniades, H. N. : Growth factors in wound healing : Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds, J. Clin. Invest., 84 : 640~646, 1989.
  48. Lynch, S. E., Williams, R. C., Polson, A. M., Howell, T. H., Zappa, U. E. and Antoniades, H. N. : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration, J. Clin. Periodontol., 16 : 545-548, 1989.
  49. Lynch, S. E., Castilla, G. R., William, R. C., Kiritsy, C. P., Howell, T.H., Reddy, M.S. and Antoniades, H.N. : The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing, J. Periodontol., 62 : 458-467, 1991.
  50. Lynch, S. E., Buser, D., Hernandez, R. A., Weber, H. P., Stich, H., Fax, H. and William, R. C. : Effects of the platelet-derived growth factor/Insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants : Results of a pilot study in beagle dogs, J. Periodontol., 62 : 710-716, 1991.
  51. Rutherford, R. B., Niekrash, L. E., Kenneky, J. E. and Charette, M.F. : Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys, J. Periodont. Res., 27 : 285-290, 1992.
  52. Giannobile, W. V., Finkelman, R. D. and Lynch, S. E. : Comparison of canine non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I, J. Periodontol., 65:1158-1168, 1994.
  53. Canalis, E. : Effect of platelet-derived growth factors on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, Metabolism., 30 : 970~975, 1981.
  54. Canalis, E. : Effect of insuline-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, J. Clin. Invest., 66 : 709-719, 1980.
  55. Stiles, C. D., Capone, G. T., Scher, C. D., Antoniades, H. N., Van Wyck, J. J. and Pledger, W. J. : Dual control of cell growth by somatomedin and platelet-derived growth factor, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76 : 1279-1283, 1979.
  56. Clemmons, D. R. and Van wyck, J. J. : Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedin-like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells, J. Clin. Invest., 75 : 1914-1918, 1985.
  57. Rutherford, R. B., Trilsmith, M. D., Ryan, H. E. and Charette, M. F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factors mitogenesis in vitro, Archs Oral Biol., 37 : 139~ 145, 1992.
  58. Matsuda, N., Lin, W. L., Kumar, N. M., Cho, M. I. and Genco, R. J. : Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, J. Periodontol., 63 : 515-525, 1992.
  59. Bolm, S., Holmstrup, P. and Dabelsteen, E. : The effect of insulin-like growth factor-I and human growth hormone on periodontal

- ligament fibroblast morphology, growth pattern, DNA synthesis, and receptor binding, *J. Periodontol.*, 13 :960-968, 1992.
60. Peterkofsky, B. and Diegelman, R. : Use of a mixture of proteinase- free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins, *Biochemistry*, 10 : 988-994, 1971.
  61. Peterkofsky, B. and Prater, W. D. : Increased collagen synthesis in kirsten sarcoma virus transformed BALB 3T3 cells grown in the presence of dibutyryl cyclic AMP, *Cell*, 3: 291-299, 1974.
  62. Nister, M., Hammacher, A., Mellstrom, K., Siegbahn, A. Ronnstrand, A., Westermarck, B. and Heidin, C. H. : A glioma-derived PDGF : A chain homodimer has different functional activities than a PDGF-AB heterodimer from human platelets, *Cell*, 52 : 791-803, 1988.
  63. Kazlauskas, A., Bowen-Pope, D., Seifert, R., Hart, C. F. and Cooper, J. A. : Different effects of homo- and heterodimers of platelet-derived growth factor and chains on human and mouse fibroblasts, *EMBO J.*, 7 : 3727-3731, 1988.
  64. Ramakrishnan, P. R. and Cho, M. I. : Identification of platelet-derived growth factor receptors on periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.*, 71 : 176 Abst. No. 563, 1992.
  65. Oates, T. W., Rouse, C. A. and Cochran, D. L. : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro, *J. Periodontol.*, 64 : 142-148, 1993.
  66. 오상덕, 이재목, 서조영 : Platelet-derived growth factor-AA, BB가 치주 인대세포의 세포활성에 미치는 영향에 대한 연구, *대한치주과학회지*, 24 : 303-320, 1994.
  67. Wergedal, J. E., Mohun, S., Lundy, M. and Bayliak, D. J. : Skeletal growth factor and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells, *J. Bon. Min. Res.*, 5 : 179-186, 1990.
  68. 김성진, 이재목, 서조영 : Insulin-like growth factor-I이 치주인대세포의 세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향에 대한 연구, *대한치주과학회지*, 24 : 219-237, 1994.
  69. Clemmons, D. R. and Shaw, D. S. : Variables controlling somatomedin producing by cultured human fibroblasts, *J. Cell. Physiol.*, 115 : 137-142, 1983.
  70. Sell, C., Ptasznik, A., Chang, C. D., Swantek, J., Cristofalo, V. J. and Baserga, R. : IGF-I receptor levels and the proliferation of young and senescent human fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 194 : 219-265, 1993.



## The combination effects of PDGF and IGF-I on the proliferation and cellular activity of periodontal ligament cells

Jo-Young Suh<sup>1</sup>, Hong-In Shin<sup>2</sup>, Hee-Moon Kyung<sup>3</sup>  
Department of Periodontology<sup>1</sup>, Oral Pathology<sup>2</sup>, Orthodontics<sup>3</sup>,  
School of Dentistry, Kyungpook National University

Current acceptable methods for promoting periodontal regeneration are based on removal of diseased soft tissue, root treatment, guided tissue regeneration, introduction of new graft materials and biological mediators. Insulin-like growth factor-I(IGF-I) and Platelet-derived growth factor-BB(PDGF-BB), the members of the polypeptide growth factor family have been reported as the biological mediators which regulate a variety cellular matrix biologic activities of wound healing process including the cell proliferation, migration and extracellular matrix synthesis.

The purposes of this study is to evaluate the combination effects of IGF-I and PDGF-BB on the cellular activity of the periodontal ligament cells to act as a regeneration promoting agent of periodontal tissue.

Human periodontal ligament cells were prepared from the first premolar tooth extracted for the orthodontic treatment and were cultured in DMEM containing 10% FBS at the 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. Author measured the DNA synthetic activity, and total protein, collagen and noncollagenous protein synthetic activities according to the concentration of 10, 100ng/ml IGF-I and 1, 10 ng/ml PDGF-BB in combination.

The results were as follows:

significantly increased in the 1 ng/ml PDGF-BB alone compared to the 10 ng/ml PDGF-BB alone( $P<0.01$ ) and in the 1 ng/ml PDGF-BB and 10, 100ng/ml IGF-I in combination compared to the 1ng/ml PDGF-BB alone( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The synthetic activity of the total protein and collagen is significantly increased like to the synthetic activity of the DNA( $P<0.05$ ). The synthetic activity of the noncollagenous protein is increased according to the concentration of IGF\_I, but not statistically significant( $P>0.05$ ). The percent of the collagen is significantly in the 1ng/ml PDGF-BB and 10ng/ml IGF-I in combination compared to the 1ng/ml PDGF-BB alone( $P<0.05$ ) and in the 10ng/ml IGF-I in combination compared to the 10ng/ml PDGF-BB alone( $P<0.05$ ).

The synthetic activity of the DNA is In conclusions, the percent study shows that PDGF-BB and IGF-I in combination have a potentiality to enhance the DNA synthesis and the total protein and collagen synthesis of the periodontal ligament cells, especially it is more significant in the low concentration

of PDGF-BB compared to the high one. Thus, the PDGF-BB and IGF-I in combination may have important roles in promotion of periodontal ligament healing, and consequently, may be useful for clinical application in periodontal regenerative procedures.