

치주인대세포와 치은섬유아세포의 단백질과 교원질 합성능에 대한 Transforming Growth Factor- β 1의 효과

김미정 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환은 구강내 세균의 감염에 의해 야기되는 염증성 질환으로 치주조직에 영향을 미침으로써 결합조직 부착과 치조골의 파괴를 야기하며 치주낭을 형성하고 더욱 진행되면 결국은 치아상실까지도 초래하게 된다. 그러므로 치주치료는 파괴된 부위에 새로운 치주인대섬유가 삽입된 신생골과 신생백악질이 재형성되고 치조골 상방 결체조직의 섬유군들이 치근면에 부착되는 치주조직 재생을 이루는 것을 궁극적인 목표로 한다¹⁻³.

치주조직은 치은, 치주인대, 백악질과 치조골로 이루어지며, 이들 조직은 세포와 세포외기질로 구성되어 있으며 각 조직의 세포외기질은 교원질, 비교원성 단백질과 단백질당으로 구성된다. 이 중 교원질이 주된 구성성분으로서 치은에서는 총단백질의 60~65%를 차지하며 type I, III 형태가 99%를 구성하고, type IV, V, VI가 소량 존재하며, 치주인대에서는 총단백질의 47~52%를 차지하며, 80% 정도의 type I 교원질과 이외 type III, IV, V, VI, VII의 형태로 구성된다. 백악질에서는 50% 정도를 구성하는 유기물질의 주성분을 이루며 이중 90%가 type I, 5%가 type III의 형태로 이

루어져 있고, 치조골에서는 유기물질의 75%를 차지하며 85%의 type I과 5%의 type III, V로 이루어져 있다^{4, 5}.

치주조직에서 세포외기질을 형성하는데 관여하는 세포로는 치은상피세포, 치은섬유아세포, 치주인대세포와 치조골세포 등이 존재하며 이중 치은섬유아세포는 치은결체조직에 65~85% 정도로 존재하며 조직손상시 증식, 분화가 활성화되어 교원질과 그외 세포외기질을 분비하고 유지하므로써 치근면과 연조직간의 유기적 결합에 독특한 기능을 담당한다고 알려져 있으며⁶⁻⁹, 치주인대세포는 치주인대의 혈관주위에 미분화된 전구세포들로 존재하고 있으며 치주치후 치유부에서 이환된 치근면에 교원질 섬유가 삽입된 신생백악질을 형성하므로써 치주조직의 재생에 특이한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹⁵.

그러므로 치주질환에 이환된 치주조직의 재생을 위해서는 세포외기질 특히 교원질의 합성이 중요하며, 치은섬유아세포와 치주인대세포가 교원질의 구조와 기능의 유지 및 치주치후의 치유과정에서 매우 중요한 부분을 차지한다고 할 수 있다.

세포와 세포외기질의 특이한 상호작용과 함께, 폴리펩타이드계 성장인자가 세포의 이주,

증식과 기질 합성에 영향을 미침으로써 세포의 성장, 형성 및 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 많은 종류의 성장인자 중 세포외기질의 합성에 영향을 미치는 성장인자로는 변형성장인자(Transforming Growth Factor, 이하 TGF로 표기)^{17~20)}, 혈소판유래성장인자^{17), 21), 22)}, 인슐린유사성장인자^{17), 18), 23)} 등이 있는데, 특히 TGF- β 는 골조직과 결합조직에서 세포의 증식과 기질합성능을 촉진하여 조직손상의 치유에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{17~20), 24)}.

TGF는 Normal Rat Kidney(이하 NRK로 표기) 섬유아세포에서 형질전환을 일으키는 원인인자로 발견되었고²⁵⁾ 정상세포와 종양세포의 성장을 변화시키는 것으로 알려져 있으며, 상피성장인자와 연관하여 α 와 β 로 구분된다²⁶⁾. TGF- α 는 50개의 아미노산으로 구성된 단일쇄 단백질로서 5.6KDa의 분자량을 가지며, 상피성장인자와 42%의 동질성을 가지므로써 상피성장인자의 수용체와 경쟁적으로 결합하여 이와 유사한 생물학적 활성을 보이는 것으로 알려져 있으며^{27~29)}, TGF- β 는 25KDa의 분자량을 가지며 이황화결합으로 연결된 2개의 아미노산 사슬로 이루어지며³⁰⁾ 골조직과 혈소판에서 주로 형성된다고 알려져 있다^{32, 33)}.

생체실험에서의 TGF- β 에 대한 연구를 살펴보면 Roberts 등²⁴⁾은 신생 생쥐에서 TGF- β 주입시 맥관형성을 유도하고 섬유아세포에 의한 교원질 합성을 활성화시키므로써 육아조직의 형성을 촉진함을 보고하였으며, Lynch 등³³⁾은 돼지의 피부창상부위에서 재상피화를 억제하고 결합조직의 양과 교원질합성, 맥관형성을 증가시킴을 관찰하였다. Noda와 Camilliere³⁴⁾는 신생쥐에서 TGF- β 주입시 골형성이 촉진된다고 보고하였으며 Joyce 등³⁵⁾은 TGF- β 가 연골아세포, 조골세포의 증식, 분화와 세포외기질 합성을 촉진하므로써 연골형성과 골형성을 유도한다고 보고하였다.

시험관적 실험에서 결합조직에 대한 연구로 Ignotz와 Massague 등^{19), 20)}은 TGF- β 가 fibronectin, 교원질의 mRNA 수준을 증가시키며 또 이들의 세포외기질로의 유입을 촉진함을 보고하였으며, Sporn 등³⁶⁾과 Overall 등^{37), 38)}은 섬유아세포에서 TGF- β 가 교원질, fibronectin, 총단백질 합성을 촉진하고 기질단백질 분해효소를 저해함으로써 세포외기질의 형성에 영향을 미침을 보고하였고, Fine과 Goldstein³⁹⁾은 사람의 폐 섬유아세포에서 세포의 증식과 교원질 합성을 촉진하므로써 조직상해의 해소에 중요한 역할을 담당함을 보고하였다. 골조직에 미치는 영향에 대하여 Pfeilschfter 등^{17), 40~42)}은 TGF- β 가 조골세포에 대한 주성인자이며 골기질의 합성을 촉진하고, 골흡수를 방해한다고 보고하였으며, Bonewald와 Mundy^{43, 44)}는 골형성과 흡수에 골결합인자로 작용하여 골의 재형성에 중요한 역할을 담당한다고 보고하였으며, Strong 등³⁸⁾은 사람의 조골세포에서 TGF- β 가 총단백질, 교원성단백질 양과 type I 교원질의 mRNA 수준을 증가시킨다고 보고하였다.

TGF- β 가 치주조직에 미치는 영향에 대한 연구로는 Overall 등³⁷⁾은 사람의 치은섬유아세포에서 TGF- β 가 단백질분해효소, 교원질, fibronectin의 합성을 조절하므로써 치주조직의 재형성과 회복에 기여함을 보고하였으며, Matsuda 등²²⁾은 쥐의 치주인대세포에서 TGF- β 가 세포의 증식능을 억제하고 세포의 화학주성, 총단백질 합성에는 미약한 영향만을 보이는 반면 교원질 합성은 증가시킴을 보고하였으며, Oates 등⁴⁵⁾은 사람의 치주인대세포에서 세포의 증식능을 증가시키며 TGF- β 의 전처치 후 혈소판유래성장인자를 병용 적용시 TGF- β 의 적용농도에 따라 혈소판유래성장인자의 증식능이 조절됨을 관찰하였고, 또 사람의 치은 섬유아세포, 치주인대세포에 대한 TGF- β 의 영향을 살펴본 Dennison 등⁴⁶⁾의 연구에서는 적용조건과 시간에 따라 두 세포군의 증식능

에 차이가 있으며 치주인대세포의 증식능이 치은섬유아세포에 비해 더 높게 나타남이 관찰되었다.

이상의 연구들을 살펴본 결과 골조직과 결합조직대사에 있어서 특히, 기질단백질 합성에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 TGF- β 를 선택하여 치은섬유아세포와 치주인대세포에 농도별로 주입하여 단백질 및 교원질 합성능을 측정해봄으로써 이들 세포에 대한 TGF의 영향을 평가하고 상호 비교해 보고자 본 실험을 실시하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료(시약)

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 DMEM로 표기)을 사용하였고, fetal bovine serum (Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그의 trypsin, bovine serum albumin (이하 BSA로 표기), ascorbic acid, dimethyl sulfoxide, highly purified bacterial collagenase type VII, L-[5-3H] proline (12.4 Ci/mmol)(New England Nuclear사, 미국), 사람에게서 추출한 TGF- β (Genzyme사, 미국)를 사용하였다.

2. 치주인대세포 및 치은섬유아세포의 세포배양

초기배양과정에서 야기될 수 있는 세균감염을 예방하기 위해 통상의 배양액에 포함되는 항생제 용량의 2배인 200U/ml penicillin(근화 제약, 한국)과 200 μ g/ml streptomycin(동아제약, 한국)이 첨가된 DMEM을 생검배지로 준비하였다. 교정치료를 목적으로 경북대학교 병원에 내원한 환자의 발거될 제1 소구치를 해당 부위로 하여 제1 소구치 인접부위의 건강한 치은조직을 절제하여 치은섬유아세포의 배양

에 이용하고, 치주인대세포의 배양에서는 조직처리 과정에서 치은조직 합입을 배제하고 치주인대조직만 채취하기 위하여 제1 소구치 부위에 내사면 절개를 가하고 치경부 1/3 부위를 소파한 후 제1 소구치를 발거하여 생검 배지에 침수시켰다. 절제된 조직과 발거한 치아를 생검배지로 3회 세척한 후 치주인대세포 배양을 위해 치근중간 1/3부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절하고, 치은섬유아세포 배양을 위해서는 절제된 조직을 세절한 다음 35mm 배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5%CO₂ 공기혼합배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 치은섬유아세포 및 치주인대세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층밀생이 형성된 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였다. 이 실험에서는 4세대에서 6세대 사이의 세포를 사용하였다.

3. 총단백질과 교원질합성능의 측정

① 농도에 따른 총단백질과 교원질 합성능의 측정

치주인대세포와 치은섬유아세포를 각각 24 well culture plates (Corning사, 미국)에 한 well 당 1 \times 10⁵ 세포를 접종한 후 10% FBS가 함유된 1ml DMEM에서 밀생상태가 될 때까지 3일간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 50 μ g/ml ascorbic acid와 1% FBS가 첨가된 DMEM으로 교환하고 2 μ Ci [3H] proline과 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ng/ml의 TGF- β 를 주입한 군을 실험군으로 하고 TGF- β 를 주입하지 않은 군을 대조군으로 하여 배양하였다. 24시간이 경과한 후 생성된 총단백질과 교원질 양을 Peterkofsky와 Diegelmann⁴⁷⁾ 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다.

각 well에 5×collagenase buffer(0.25M Tris, 0.025M CaCl₂와 0.0125M N-ethylmaleimide 함유, pH7.4)를 250μl를 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 300ml를 첨가한 후 잘 혼합하여 4°C 에서 30분간 방치한 후 1000×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 5×collagenase buffer 100ml를 첨가하였다.

microfuge tube에 각 용액을 반으로 나누어 넣은 후 교원질 합성양을 측정하기 위한 microfuge tube에는 15U collagenase가 함유된 collagenase buffer를 15μl 주입하고, 총단백질 합성양을 측정하기 위한 microfuge tube에는 15U collagenase가 함유되지 않은 collagenase buffer를 15μl 주입하여 37°C에서 90분간 배양한 다음 collagenase의 활성을 정지시키기 위해 0°C로 냉각시키고 각 tube에 50% TCA/2.5% tannic acid 50μl를 첨가하여 4°C 에서 30분간 방치하였다.

교원질 합성양을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유된 microfuge tube를 1000×g에서 5분간 원침 후 상층액과 5% TCA/1mM proline으로 세척한 세척액을 counting vial에 담아 scintillation cocktail 5ml를 넣어 liquid scintillation counter (Packard 사, 미국)로 5분간 방사능을 측정하였다.

총단백질양을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유되지 않은 microfuge tube를 1000×g에서 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 다음의 공식에 의거하여 계산하였다⁴⁸⁾.

비교원성 단백질양은 총단백질 양에서 교원질양을 공제하여 산출하였다.

② 시간경과에 따른 총단백질과 교원질 합성능의 측정

TGF-β를 투여하지 않은 군을 대조군으로 하고, TGF-β 1, 5ng/ml을 투여한 군을 실험군으로 하여 치주인대세포와 치은섬유아세포에 투여한 후 24, 48시간동안 배양하였다. 각각 배양 24시간 전에 2μCi[³H] proline을 주입하여 총단백질과 교원질 합성양을 상기의 방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

III. 결 과

1. 치주인대세포의 총단백질 및 교원질 합성능에 미치는 TGF-β의 농도에 따른 효과

치주인대세포의 총단백질 합성양에 미치는 TGF-β의 효과는 5 ng/ml 농도까지는 농도의 존적으로 증가하였으나 10ng/ml 농도에서 약간 감소하는 경향을 보였고, 대조군은 38.7±2.3 dpm×10³/Well, 0.5 ng/ml는 64.3±2.9 dpm×10³/Well, 1ng/ml는 69.5±9.2 dpm×10³/Well, 2.5ng/ml는 82.2±2.6 dpm×10³/Well, 5ng/ml는 92.8±14.0 dpm×10³/Well, 10ng/ml는 77.9±4.9 dpm×10³/Well로 나타났으며, 모든 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.01)를 나타내었다(표 1 참조).

총단백질을 교원질과 비교원성 단백질로 분

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

* dpm : disintegration per minute

II 1. Dose-response effect of transforming growth factor- β on total protein synthesis by human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts cultured for 24 hours in the presence of 1% fetal bovine serum

| Conc.(ng/ml) | Total Protein(dpm \times 103/well) | |
|--------------|--------------------------------------|------------------|
| | PDL | HGF |
| 0 | 38.7 \pm 2.3 | 43.7 \pm 2.5 |
| 0.5 | 64.3 \pm 2.9 | 84.1 \pm 1.7** |
| 1 | 69.5 \pm 9.2 | 90.8 \pm 2.2* |
| 2.5 | 82.2 \pm 2.6 | 106.1 \pm 8.8* |
| 5 | 92.8 \pm 14.0 | 96.1 \pm 5.2 |
| 10 | 77.9 \pm 4.9 | 76.5 \pm 2.5 |

Cells were seeded at 1×10^5 cells/ml in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbecco's modified Eagle medium containing 1% fetal bovine serum, 50 μ g/ml ascorbic acid and 2 μ Ci [3H] proline and the indicated amounts of transforming growth factor- β were added. Total protein synthesis were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of four determinations.

* : significantly different between two groups (P < 0.05)

** : significantly different between two groups (P < 0.01)

II 2. Dose-response effect of transforming growth factor- β on collagenous and noncollagenous protein synthesis by human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts cultured for 24 hours in the presence of 1% fetal bovine serum

| Conc. (ng/ml) | NCP(dpm \times 10 ³ /well) | | CDP(dpm \times 10 ³ /well) | | % of collagen(%) | |
|------------------|---|-----------------|---|------------------|------------------|---------------------|
| | PDL | HGF | PDL | HGF | PDL | HGF |
| 0 | 12.4 \pm 2.6 | 15.3 \pm 1.8 | 26.2 \pm 2.8 | 28.4 \pm 3.0 | 28.78 \pm 5.61 | 25.85 \pm 3.88 |
| 0.5 | 27.9 \pm 1.0 | 33.4 \pm 3.4 | 36.4 \pm 1.9 | 50.7 \pm 4.2* | 19.44 \pm 0.25 | 22.14 \pm 3.23 |
| 1 | 30.6 \pm 11.1 | 27.6 \pm 9.8 | 38.9 \pm 2.7 | 63.2 \pm 5.3** | 18.54 \pm 1.25 | 22.95 \pm 0.41* |
| 2.5 | 37.0 \pm 2.4 | 40.7 \pm 3.6 | 45.2 \pm 1.9 | 65.4 \pm 5.3** | 18.54 \pm 1.52 | 22.95 \pm 0.41** |
| 5 | 46.9 \pm 14.8 | 25.5 \pm 6.3 | 45.9 \pm 0.9 | 70.6 \pm 3.5** | 16.39 \pm 3.89 | 34.85 \pm 6.74** |
| 10 | 35.0 \pm 5.3 | 18.9 \pm 4.3* | 42.9 \pm 1.6 | 57.6 \pm 4.3** | 18.79 \pm 2.51 | 36.821 \pm 6.24** |

Confluent culture containing 2 μ Ci [3H] proline and 50 μ g/ml ascorbic acid in the medium were treated with 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ng/ml of transforming growth factor- β for 24 hours. % of collagen is the percentage of newly synthesized collagen relative to total protein. Each value represents the mean and S.D. of four determinations.

* : Significantly different between two groups (P < 0.05)

** : Significantly different between two groups (P < 0.01)

NCP : Noncollagenous protein

CDP : Collagenase digestible protein

류하여 비교하였을 때 비교원성 단백질 합성양과 교원질 합성양도 총단백질 합성양과 마찬가지로 5ng/ml까지 농도의존적으로 증가하고 10ng/ml 농도에서는 감소하는 경향을 보였으며, 교원질 합성양이 비교원성 단백질보다 약간 높게 나타났다(표 2 참조).

비교원성 단백질 합성양은 대조군에서 12.4 ± 2.6 dpm $\times 10^3$ /Well, 0.5ng/ml에서 27.9 ± 1.0 dpm $\times 10^3$ /Well, 1ng/ml에서 30.6 ± 11.1 dpm $\times 10^3$ /Well, 2.5ng/ml에서 37.0 ± 2.4 dpm $\times 10^3$ /Well, 5ng/ml에서 46.9 ± 14.8 dpm $\times 10^3$ /Well, 10ng/ml에서 35.0 ± 5.3 dpm $\times 10^3$ /Well로 나타났으며, 모든 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다(표 2 참조).

교원질 합성양은 대조군에서 26.2 ± 2.8 dpm $\times 10^3$ /Well, 0.5ng/ml에서 36.4 ± 1.9 dpm $\times 10^3$ /Well, 1ng/ml에서 38.9 ± 1.7 dpm $\times 10^3$ /Well, 2.5ng/ml에서 45.3 ± 1.9 dpm $\times 10^3$ /Well, 5ng/ml에서 45.9 ± 0.9 dpm $\times 10^3$ /Well, 10ng/ml에서 42.9 ± 1.6 dpm $\times 10^3$ /Well로 나타났으며, 모든 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.01)를 보였다(표 2 참조).

총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 TGF- β 를 투여한 모든 군에서 대조군에 비해 미약하게 감소되는 경향을 나타내었고, 대조군에서 $28.78 \pm 5.61\%$, 0.5ng/ml에서 $19.44 \pm 0.25\%$, 1ng/ml에서 $21.63 \pm 9.02\%$, 2.5ng/ml에서 $18.54 \pm 1.25\%$, 5ng/ml에서 $16.39 \pm 3.89\%$, 10 ng/ml에서 $18.79 \pm 2.51\%$ 로 나타났으며, 대조군에 비해 2.5, 5ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다(표 2 참조).

2. 치은섬유아세포의 총단백질 및 교원질 합성능에 미치는 TGF- β 의 농도에 따른 효과

치은섬유아세포의 총단백질 합성양에 미치는 TGF- β 의 효과는 2.5 ng/ml 투여군까지는 농도의존적으로 증가하였으며 그 이상의 농

도에서 약간 감소하는 경향을 보였다. 대조군은 43.7 ± 2.5 dpm $\times 10^3$ /Well, 0.5ng/ml는 84.1 ± 1.7 dpm $\times 10^3$ /Well, 1ng/ml는 90.8 ± 2.2 dpm $\times 10^3$ /Well, 2.5ng/ml는 106.1 ± 8.8 dpm $\times 10^3$ /Well, 5ng/ml는 96.1 ± 5.2 dpm $\times 10^3$ /Well, 10ng/ml는 76.5 ± 2.5 dpm $\times 10^3$ /Well로 나타났으며, 모든 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.01)를 나타내었다(표 1 참조).

총단백질을 교원질과 비교원성 단백질로 분류하여 비교하였을 때 비교원성 단백질 합성양은 2.5ng/ml까지, 교원질 합성양은 5ng/ml 농도까지 농도의존적으로 증가하였으며 그 이상의 농도에서 감소하는 경향을 보였으며, 교원질 합성양이 비교원성 단백질보다 약간 높게 나타났다(표 2 참조).

비교원성 단백질 합성양은 대조군에서 15.2 ± 1.8 dpm $\times 10^3$ /Well, 0.5ng/ml에서 33.4 ± 3.4 dpm $\times 10^3$ /Well, 1ng/ml에서 27.6 ± 9.8 dpm $\times 10^3$ /Well, 2.5ng/ml에서 40.7 ± 3.6 dpm $\times 10^3$ /Well, 5ng/ml에서 25.5 ± 6.3 dpm $\times 10^3$ /Well, 10ng/ml에서 18.9 ± 4.3 dpm $\times 10^3$ /Well로 나타났으며, 0.5, 2.5ng/ml 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.01)를 보였다(표 2 참조).

교원질 합성양은 대조군에서 28.4 ± 3.0 dpm $\times 10^3$ /Well, 0.5ng/ml에서 50.7 ± 4.2 dpm $\times 10^3$ /Well, 1ng/ml에서 63.2 ± 7.9 dpm $\times 10^3$ /Well, 2.5ng/ml에서 65.4 ± 5.3 dpm $\times 10^3$ /Well, 5ng/ml에서 70.6 ± 3.5 dpm $\times 10^3$ /Well, 10ng/ml에서 57.6 ± 4.3 dpm $\times 10^3$ /Well로 나타났으며, 모든 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.01)를 보였다(표 2 참조).

총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 농도증가에 따라 미약하게 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적인 유의성은 없었다(P>0.05)(표 2 참조). 대조군에서 $25.85 \pm 3.88\%$, 0.5ng/ml에서 $22.14 \pm 3.23\%$, 1ng/ml에서 $32.01 \pm 10.51\%$, 2.5ng/ml에서 $22.95 \pm 0.41\%$, 5 ng/ml에서 $34.85 \pm 6.74\%$, 10ng/ml에서 $36.82 \pm 6.24\%$

로 나타났다(표 2 참조).

3. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 총단백질 및 교원질 합성능에 대한 변형성장인자- β 의 농도에 따른 영향에 대한 비교

TGF- β 의 적용에 따른 치주인대세포와 치은섬유아세포의 총단백질 및 교원질 합성능을 비교하면, 총단백질 합성량은 10ng/ml 투여군을 제외한 모든 농도군에서 치주인대세포에 비해 치은섬유아세포에서 더 높게 나타났으며, 교원질 합성량은 모든 군에서, 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 대조군을 제외한 모든 군에서 치은섬유아세포에서 약간 높게 나타났다.

비교원성 단백질의 합성량은 2.5 ng/ml 농도까지는 유사한 경향을 보였으나, 5, 10ng/ml 투여군에서 치은섬유아세포에서의 비교원성 단백질 합성량이 상대적으로 크게 감소하므로써 치주인대세포에서 더 높게 나타났다. 총단백질 합성량은 0.5, 1, 2.5ng/ml 투여군에서, 비교원성 단백질 합성량은 10ng/ml 투여군에서 그리고 교원질 합성량은 대조군을 제외한 모든 군에서 군간 통계학적으로 유의한 차이($P < 0.05$)를 보였으며, 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 2.5, 5, 10ng/ml 투여군에서 군간 통계적으로 유의한 차이($P < 0.05$)를 보였다(표 1, 2 참조).

4. 시간경과에 따른 치주인대세포의 총단백질 및 교원질 합성능에 대한 변형성장인자- β 의 영향

시간 경과에 따른 치주인대세포에 대한 TGF- β 의 영향은 총단백질, 교원질 및 비교원성 단백질 합성량이 24시간 투여군에 비해 48

시간 투여한 군에서 감소하는 경향을 보였으며, 총단백질 합성량은 모든 군에서, 교원질 합성량은 대조군과 1ng/ml 투여군에서 그리고 비교원성 단백질 합성량은 1, 5ng/ml 투여군에서 군간 통계적으로 유의한 차이($P < 0.05$)를 보였다(그림 1 참조).

총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 48시간 투여군에서 비교원성 단백질의 합성량이 상대적으로 크게 감소하므로써 24시간 투여군에 비해 더 증가된 양상을 보였으며, 1ng/ml 투여군에서 군간 통계적으로 유의한 차이($P < 0.05$)를 보였다(그림 2 참조).

5. 시간경과에 따른 치은섬유아세포의 총단백질 및 교원질 합성능에 대한 변형성장인자- β 의 영향

시간 경과에 따른 치은섬유아세포에 대한 TGF- β 의 영향은 총단백질 합성량은 24시간 투여군에 비해 1ng/ml에서는 48시간 투여군이 낮았고, 5ng/ml 에서는 48시간 투여군에서 더 높게 나타났다.

비교원성 단백질 합성량은 24시간 투여군에 비해 48시간 투여한 군에서 더 낮게 나타났으며, 교원질의 합성량은 24시간 투여군에 비해 1ng/ml 투여군은 48시간에서 낮았고 5 ng/ml 투여군은 48시간 투여군에서 더 높게 나타났다. 총단백질 합성량과 비교원성 단백질 합성량은 대조군과 1ng/ml 투여군에서, 교원질 합성량은 5ng/ml 투여군에서 군간 통계적으로 유의한 차이($P < 0.05$)를 보였다(그림 3 참조).

총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 48시간 투여군에서 24시간 투여군에 비해 더 증가된 양상을 보였으며, 대조군과 1ng/ml 투여군에서 군간 통계적으로 유의한 차이($P < 0.05$)를 보였다(그림 4 참조).

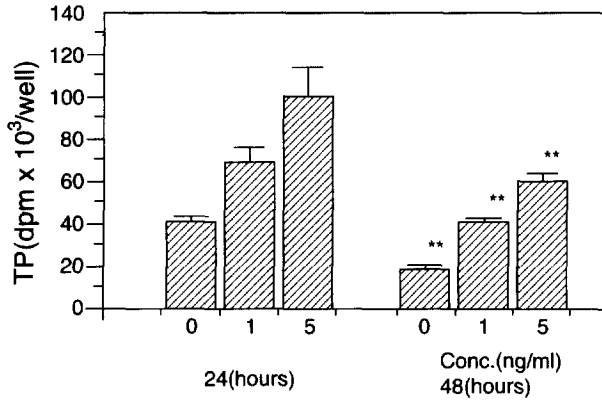


그림 1. Time-response effect of 1, 5 ng/ml transforming growth factor- β on total protein synthesis by human periodontal ligament cells cultured for 24, 48 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium, 50 μ g/ml ascorbic acid and 2 μ Ci [³H] proline was added before the final 24 hours as described in materials and methods. The values are expressed as mean and S.D. of four determinations.

** : significantly different between two groups (P < 0.01)

TP : total protein

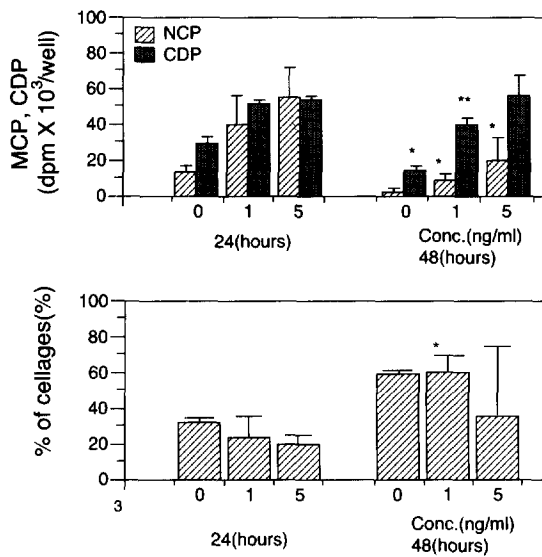


그림 2. Time-response effect of 1, 5 ng/ml transforming growth factor- β on collagenous and noncollagenous protein synthesis by human periodontal ligament cells cultured for 24, 48 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium, 50 μ g/ml ascorbic acid and 2 μ Ci [³H] proline was added before the final 24 hours as described in materials and methods. The values are expressed as mean and S.D. of four determinations.

* : Significantly different between two groups (P<0.05)

** : Significantly different between two groups (P<0.01)

NCP : noncollagenous protein

CDP : collagenase digestable protein

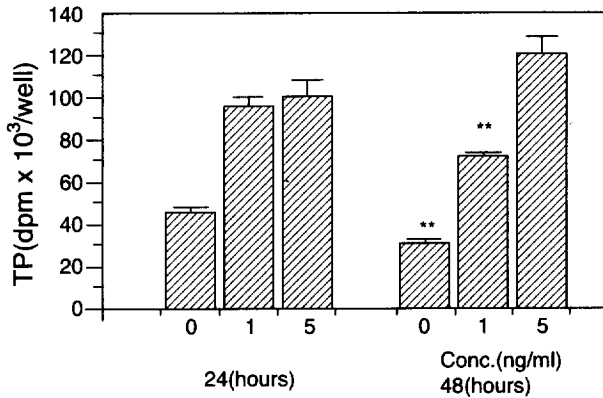


그림. 3. Time-response effect of 1, 5 ng/ml transforming growth factor- β on total protein synthesis by human gingival fibroblasts cultured for 24, 48 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium, 50 μ g/ml ascorbic acid and 2 μ Ci [³H] proline was added before the final 24 hours as described in materials and methods. The values are expressed as mean and S.D. of four determinations.

** : significantly different between two groups (P<0.01)

TP : total protein

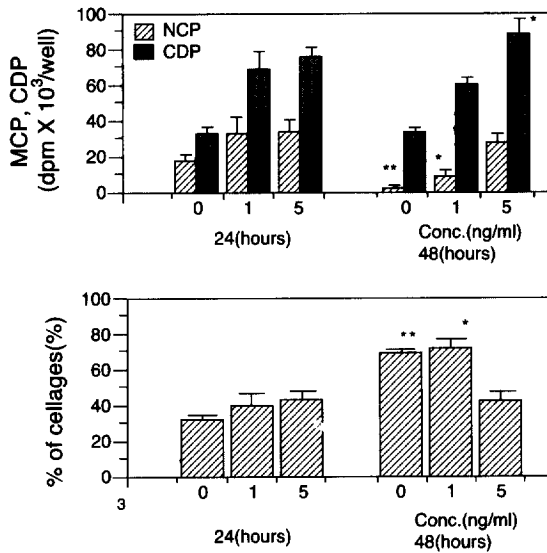


그림. 4. Time-response effect of 1, 5 ng/ml transforming growth factor- β on collagenous and noncollagenous protein synthesis by human gingival fibroblasts cultured for 24, 48 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium, 50 μ g/ml ascorbic acid and 2 μ Ci [³H] proline was added before the final 24 hours as described in materials and methods. The values are expressed as mean and S.D. of four determinations.

* : Significantly different between two groups (P<0.05)

** : Significantly different between two groups (P<0.01)

NCP : noncollagenous protein

CDP : collagenase digestible protein

IV. 총괄 및 고안

치주치료시 이상적인 치유양상은 치주질환에 이환된 부위에서 신생골, 신생백악질이 형성되고 새로운 치주인대섬유가 삽입, 재배열되는 재생의 형태이며, 치주치료는 이러한 재생의 치유과정을 유도함으로써 치주조직의 구성성분인 치은, 치주인대, 치조골과 백악질을 질환에 이환되기 전의 원래의 상태로 회복시키는 것을 목적으로 한다^{1~3)}.

치주치치후 치유부로는 치은상피조직, 치은결체조직, 치주인대조직, 치조골조직에서 유래한 세포들이 이주해올 수 있고 이들 치유부로 이주해 오는 세포의 표현형에 따라 치유양상이 결정되게 되는데⁴⁹⁾, 이중 치주인대조직에서 유래한 세포가 치주조직의 재생에 기여하는 것으로 알려져 있으며^{14, 15)}, 치은결체조직에서 유래한 세포는 치근면과 연조직간의 유기적 결합에 영향을 미침으로써 조직의 치유에 기여한다고 알려져 있다^{6, 7)}.

폴리펩타이드계 성장인자는 이러한 세포들의 치유부로의 이주, 증식과 기질합성에 관여하여 치주조직의 재생에도 영향을 미치게 되는데¹⁶⁾, 많은 성장인자 중 TGF- β 는 상피세포의 증식을 억제하고 중배엽세포의 증식을 촉진하며³⁶⁾, 특히 섬유아세포와 조골세포의 화학주성과 증식을 자극하고 세포외기질의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다^{19, 24, 50, 51)}. 세포외기질의 합성을 촉진하는 TGF- β 의 효과는 다음의 2가지 작용기전으로 설명될 수 있다. 첫째, 교원질, fibronectin, osteonectin과 같은 세포외기질 구성성분의 유전자전사를 조절하여 m-RNA 수준을 증가시키므로써 합성을 촉진하게 된다²⁴⁾. 둘째, 새로 형성된 기질단백질의 분해를 억제하는 작용을 나타내는데 이러한 효과는 matrix metalloproteinase(이하 MMP로 표기), serine protease(plasminogen activator), thiol protease등의 분해효소의 합성과 분비를 억제하고, type I plasminogen activator

inhibitor와 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase(이하 TIMP로 표기)의 합성, 분비를 증가시키므로써 나타난다고 알려져 있다^{37, 38)}. 이와 같은 과정을 통해 TGF- β 는 세포외기질의 주 구성성분의 합성을 조절하며 또한 세포의 증식과 분화를 조절하는데, 세포의 종류와 배양조건에 따라 세포성장을 자극 혹은 억제시키며^{29, 31)} 혈소판유래성장인자, TGF- α , 상피성장인자, 섬유아세포성장인자 등의 다른 성장인자와 병용사용시 다른 성장인자의 효과를 조절하는 작용을 나타내기도 한다고 알려져 있다⁵²⁾.

치주조직은 세포와 세포외기질로 이루어지며, 교원질이 치주조직의 세포외기질에서 주성분을 차지하며 치은과 치주인대에서 특히 많은 비율로 존재하고 있으므로^{4, 5)} TGF- β 가 치주인대세포와 치은섬유아세포에 미치는 영향을 평가하는 것은 치주조직의 재생을 유도하기 위한 연구과정에서 중요한 의의를 가진다고 볼 수 있다. 교원질은 (Gly-X-Y)_n로 나타내어지는 삼중나선구조를 가지며 X, Y 위치에 proline, hydroxyproline 등의 아미노산이 존재하는데 이중 proline이 구조적으로 안정하며 타단백질(41%)에 비해 교원질(22.2%)내에 특이하게 많은 비율을 차지하므로⁵³⁾ 이 실험에서 proline을 교원질 합성의 측정에 이용하였다.

TGF- β 의 교원질 합성능에 관한 연구를 살펴보면, Mundy와 Bonewald^{43), 44)}는 조골세포에서 TGF- β 적용시 Alkaline phosphatase, type I 교원질과 다른 골단백질의 형성이 증가한다고 보고하므로써 TGF- β 가 골의 재형성에 직접 관여할 것이라고 보고하였으며, Centrella 등⁵⁰⁾은 쥐의 조골세포에 0, 0.15, 1.5, 15 ng/ml 농도의 TGF- β 를 적용하였을때, 1.5 ng/ml, 15 ng/ml 농도에서 농도에 따라 교원성 및 비교원성 단백질이 증가하는 경향을 보였으며 특히 교원성 단백질의 합성이 높게 나타나 교원질의 상대적 비율도 농도에 따라 증가하는 경

향을 나타내었다고 보고하였다. Strong 등¹⁸⁾은 사람의 조골세포유사세포에 0, 0.01, 0.1, 0.3, 1, 10ng/ml의 TGF- β 를 주입시 1ng/ml농도까지 농도에 따라 단백질 합성이 증가하며 10 ng/ml에서 감소하는 경향을 보였으며, 교원질에 비해 비교원성 단백질의 합성이 더 높게 나타났으며 이러한 단백질 합성능은 24시간까지 증가하고 이후로 감소하는 경향을 나타내었다고 보고하였다.

Roberts 등²⁴⁾은 사람의 피부섬유아세포에서 5 ng/ml, 10ng/ml의 TGF- β 주입시 교원질 합성과 교원질의 상대적 비율이 증가하며, NRK 세포에서 교원질 합성의 상대적 비율이 0.25 ng/ml에서 최대를 나타내며 이후로는 감소하는 경향을 나타내었다고 보고하였다. Igotz 등³⁰⁾은 NRK 세포에서 교원질의 mRNA 수준이 농도의존적으로 증가하며 2.5ng/ml에서 최대를 보이고 그 이상의 농도에서 일정하게 유지됨을 관찰하였고 이러한 증가양상은 10시간에 최대를 보이며 최소 24시간까지 지속됨을 관찰하였다. Fine과 Goldstein³⁹⁾은 사람의 폐섬유아세포에 TGF- β 주입시 0.1ng/ml의 저농도에서 총단백질에 비해 교원질 합성이 선택적으로 촉진되며 1ng/ml의 농도에서는 교원질과 총단백질이 2~3배로 유사하게 증가됨을 보고하였다. 또 이들은 이러한 교원질 합성의 증가양상이 72시간까지 지속됨을 보고하였다. Wrana 등⁵¹⁾은 치은섬유아세포에서 0, 0.1, 1 ng/ml농도의 TGF- β 적용시 총단백질 및 교원질 합성이 증가하며 0.75~1.0 ng/ml농도에서 최대의 효과를 나타내고 총단백질과 교원질 합성의 증가가 유사한 정도로 나타남으로써 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 농도에 따라 별변화가 없었음을 보고하였으며 Matsuda 등²²⁾은 쥐의 치주인대세포에서 TGF- β 적용시 총단백질 합성에는 별영향을 미치지 않는 반면 교원질 합성을 증가시킴을 보고하였다. Alvares 등⁵⁴⁾은 사람의 치주인대세포에서 1ng/ml, 10ng/ml의 TGF를 적용시 MMP-1

mRNA를 25~50%까지 감소시키므로써 이들 세포의 교원질 합성능의 증가에 기여한다고 보고하였다.

이 연구에서 TGF- β 가 치주인대세포와 치은섬유아세포에서 총단백질과 교원질, 비교원성 단백질의 합성능에 미치는 영향을 알아본 실험의 결과 두 세포 모두 2.5~5ng/ml 농도까지 농도가 증가함에 따라 총단백질, 비교원성 단백질, 교원질의 합성이 증가하다가 10ng/ml 농도에서 감소하는 경향을 보였으며, 각각의 증가양상이 유사하게 나타남으로써 교원질의 상대적 비율에는 미약한 영향만을 나타내었다. 이러한 양상은 조골세포유사세포에 대한 Strong 등³⁹⁾의 연구결과와 일치하는데, 이와 같은 고농도의 성장인자에 의한 단백질 합성의 감소양상은 Kawamoto 등⁵⁵⁾의 연구에서 보고한 바와 같이 농도가 증가함에 따라 성장인자에 대한 새로운 수용체의 합성에 많은 양의 에너지가 소비됨에 의한 것으로 사료된다. 그러나, 10ng/ml, 15ng/ml 농도까지 증가하는 양상을 보고한 Fine과 Goldstein³⁹⁾, Centrella 등⁵⁰⁾의 연구결과와는 차이를 보이는데 적용된 세포의 종류, 세포 접종수에 의한 세포의 밀도, 세포배양기간과 실험에 사용된 배양액에 포함된 FBS의 농도 등 실험방법의 차이에 의한 것으로 사료된다. 치주인대세포에서의 총단백질에 대한 교원질의 상대적인 비율은 농도에 따라 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, 이는 Matsuda 등⁴⁵⁾의 연구에서 교원질 합성이 선택적으로 증가되었다는 보고와는 차이를 보이는데 이 차이는 Matsuda 등²¹⁾은 쥐의 치주인대세포를 사용하는데 반해 본 연구에서는 사람의 치주인대세포를 사용함에 의한 배양된 치주인대세포의 종의 차이에 의한 것으로 사료된다.

TGF- β 의 각 적용농도에 따른 치주인대세포와 치은섬유아세포의 단백질 합성능을 비교하였을 때 모든 경우에서 치은섬유아세포의 총단백질 및 교원질 합성능이 더 높은 경향을

보였는데 이러한 양상은, 각각의 세포자체의 증식능의 차이와 표현형 및 생화학적 특성의 차이에 의한 것으로 사료된다. 즉, 손 등⁵⁶⁾이 치은섬유아세포가 치주인대세포에 비해 세포의 증식속도와 2배증식시간이 더 빠르게 나타난다고 보고한 바, 각각의 세포의 증식능의 차이를 고려할 수 있으며, Overall 등³⁸⁾이 TGF- β 가 치은섬유아세포에서 MMP-1을 50~60% 감소시키는 동시에 TIMP mRNA 수준을 1.5~2.2 배로 증가시킨다고 보고한 반면, Alvares 등³⁹⁾은 TGF- β 가 치주인대세포에서 MMP-1의 전사는 20~50% 정도로 감소시키거나 TIMP-1 mRNA 수준에는 영향을 미치지 않는다고 보고한 바와 같이 두 세포 자체의 특성의 차이를 고려할 수 있다. 또 이와같은 기전의 차이에 의해 치주인대세포에서의 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율이 치은섬유아세포에 비해 더 낮게 나타났다고 볼 수 있다. 비교원성 단백질의 합성은 2.5ng/ml까지는 치은섬유아세포에서 약간 더 높게 나타났으나 5, 10ng/ml 농도에서는 치주인대세포에서 더 높게 나타남으로써 5, 10ng/ml 농도의 TGF- β 는 치주인대세포에 비해 치은섬유아세포의 교원질에 특이한 작용을 나타내었다.

이 연구에서는 시간경과에 따른 단백질 합성능을 평가하기 위해 1, 5ng/ml 농도를 선택하여 24, 48시간 처리시의 TGF- β 의 영향을 측정하였는데, 이러한 농도선정은 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10ng/ml 농도를 24시간 투여한 앞의 실험결과 2.5ng/ml 농도와 5ng/ml 농도에서 가장 높은 단백질 및 교원질 합성능을 보인 것을 기초로하여, 이에 가까운 농도를 선택하여 시행하였다. TGF- β 의 적용시간에 따른 총단백질, 비교원성 단백질, 교원성 단백질의 합성능은 치주인대세포와 치은섬유아세포 모두 24시간에 비해 48시간 투여군에서 더 낮게 나타났는데, 이는 TGF- β 가 신속한 일과성의 효과를 나타낸다는 Strong 등¹⁸⁾의 보고와 일치하며, 이와 같은 시간경과에 따른 총단백질, 교원질

및 비교원성 단백질의 감소양상은 Pfeilschifter 등⁴¹⁾의 연구에서 보고된 바와 같이 시간의 경과에 따라 TGF- β 농도와 TGF- β 수용체 수간의 비율의 변화에 의한 세포반응의 감소에 의한 것으로 사료된다. 그리고 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 48시간 투여시 24시간 투여군에 비해 약간 증가된 양상을 나타내었는데 이는 비교원성 단백질이 상대적으로 크게 감소함에 기인한 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해 보면 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 TGF- β 의 농도가 증가함에 따라 치주인대세포에서는 약간 감소되고 치은섬유아세포에서는 미약하게 증가되어 나타났으며, 치주인대세포에 비해 치은섬유아세포의 교원질에 특이한 작용을 나타내었으며, 적용시간에 따른 비교시 24시간 투여군에 비해 48시간 투여시 더 증가된 양상을 나타내었다. 전반적으로 TGF- β 는 치주인대세포와 치은섬유아세포의 총단백질, 교원질 및 비교원성 단백질의 합성을 증가시키는 것으로 나타났으며 이러한 세포외기질 단백질 합성을 증가시키므로써 치주조직의 재생과 치주치후의 치유에 있어서 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. 세포외기질 단백질로는 fibronectin도 중요한 부분을 차지하므로 이들 세포의 fibronectin에 대한 TGF- β 의 영향에 대한 연구와 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식, 분화와 alkaline phosphatase, osteocalcin 등에 미치는 TGF- β 의 영향에 대한 부가적인 연구가 시행된다면 치주조직재생을 위한 TGF- β 의 적용에 보다 더 기여하게 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

치주조직의 재생을 유도하기 위한 방법으로 연구되고 있는 폴리펩타이드계 성장인자 중 미분화 중배엽세포의 활성을 조절하는 것으로 알려져있는 TGF- β 를 이용하여 배양된 치주인

대세포와 치은섬유아세포에 농도별, 시간별로 주입하여 두 세포의 총단백질, 교원질 합성능을 알아봄으로써 TGF- β 가 이들세포의 단백질 합성능에 미치는 영향을 평가하고 각 조건에서 두 세포간의 단백질 합성능을 상호 비교해 보고자 본 실험을 실시하였다.

교정치료를 목적으로 내원한 환자의 제 1 소구치 부위의 정상치은을 절제하고, 건강한 제 1 소구치를 발거하여 치은섬유아세포와 치주인대세포를 분리, 배양하여 TGF- β 를 주입시키지 않은 군을 대조군으로 하고, TGF- β 를 각각 0.5, 1, 2.5, 5, 10ng/ml 농도로 주입시킨 군을 실험군으로 하여 24시간 배양하여 두 세포군의 단백질 합성능을 측정하였으며, 1, 5 ng/ml 농도를 선택하여 24, 48시간 동안 배양하여 총단백질 및 교원질 합성능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

치주인대세포와 치은섬유아세포의 총단백질과 교원질합성능에 미치는 TGF- β 의 효과는 치주인대세포의 총단백질, 비교원성 단백질과 교원질 합성량과 치은섬유아세포의 교원질 합성량은 5ng/ml 농도까지 농도의존적으로 증가하였으며, 치은섬유아세포의 총단백질과 비교원성단백질 합성량은 2.5ng/ml 농도까지 농도의존적으로 증가하였으며, 그 이상의 농도에서 약간 감소하는 경향을 보였다($P < 0.05$). 총단백질에 대한 교원질의 상대적인 비율은 치주인대세포에서 농도에 따라 미약하게 감소하는 경향을 나타내었으며 2.5, 5 ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이($P < 0.05$)를 보였고, 치은섬유아세포에서는 미약하게 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적인 유의성은 없었으므로($P > 0.05$) TGF- β 가 주어진 농도에서 교원질의 합성을 특이하게 증가시키는 효과는 없음을 나타내었다.

치주인대세포와 치은섬유아세포에 대한 TGF- β 의 효과를 비교하였을때 치주인대세포에 비해 치은섬유아세포에서 총단백질, 교원질 합성량과 총단백질에 대한 교원질의 상대

적 비율이 약간 높게 나타났으며($P < 0.05$), 비교원성 단백질의 합성량은 2.5ng/ml 농도까지는 유사한 경향을 보였으나, 5, 10ng/ml 투여군에서 치은섬유아세포에서의 비교원성 단백질 합성량이 감소하므로써 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율이 뚜렷히 증가한 양상을 보였다($P < 0.05$).

시간경과에 따른 치주인대세포와 치은섬유아세포의 총단백질과 교원질 합성능에 대한 TGF- β 의 영향은 두 세포 모두 총단백질, 교원질 및 비교원성 단백질 합성량이 24시간 투여군에 비해 48시간 투여한 군에서 감소하는 경향을 보였으나($P < 0.05$), 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 48시간 투여군에서 비교원성 단백질의 합성량이 상대적으로 크게 감소하므로써 24시간 투여군에 비해 더 증가된 양상을 보였다($P < 0.05$).

참고문헌

1. Lindhe, L. : Textbook of clinical periodontology, 2nd ed., Munksguard, Copenhagen, p450, 1989.
2. 박준봉, 서조영외 : 치주과학, 지영문화사, 473-476, 1992.
3. The American academy of periodontology : Proceedings of the world workshop in clinical periodontics, V-20, 1989.
4. Mariotti, M. : The extracellular matrix of the periodontium : dynamic and interactive tissues, Periodontol. 2000, 3 : 39-63, 1993.
5. Narayanan, A. S. and Page, R. C. : Connective tissue of the periodontium : A summary of current work, Collagen Rel. Res., 3 : 33-64, 1983.
6. Fernyhough, W. and Page, R. C. : Attachments, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin - treated normal and diseased

- tooth roots, *J. Periodontol.*, 54 : 133-140, 1983.
7. Bowers, G. M., Schallhorn, R. G. and Mellonig, J. T. : Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review, *J. Periodontol.*, 53 : 509-512 : 1982.
 8. Bhaskar, S. N. : *Orbans Oral histology and embryology*, 10th edition, St.Louis U.S.A., 1986.
 9. Mariotti, A. and Cochran, D. L. : Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva, *J. Periodontol.*, 61 : 103-111, 1990.
 10. 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.
 11. McCulloch, C. A. G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice, *Anat. Rec.*, 211 : 258-262, 1985.
 12. Davidson, L. and McCulloch, C. A. G. : Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations, *J. Periodont. Res.*, 21 : 414- 428, 1986.
 13. Aukhil, I., Simpson, D. M., Suggs, C. and Pettersson, E. : In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament : An experimental study using physical barriers, *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 862-868, 1986.
 14. Shore, R. C. and Berkovitz, B. K. B. : An ultrastructural study of periodontal ligament fibroblasts in relation to their possible role in tooth eruption and intracellular collagen degradation in the rat, *Archs. Oral Biol.*, 24 : 155-164, 1979.
 15. 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.
 16. Terranova, V. P. and Wikesjö, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium, *J. Periodontol.*, 58 : 371-380, 1987.
 17. Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R. G. K., Minne, H. W. and Ziegler, R. : Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors : a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor β , *Endocrinol.*, 127 : 69-75, 1990.
 18. Strong, D. D., Beachler, A. L., Wergedal, J. E. and Linkhart, T. A. : Insulin-like growth factor II and transforming growth factor β regulate collagen expression in human osteoblastlike cells in vitro, *J. Bone Min. Res.*, 6 : 15-23, 1991.
 19. Ignots, R. A. and Massague, J. : Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix, *J. Biol. Chem.*, 261 : 4337-4345, 1986.
 20. Ignatz, R. A., Endo, T. and Massague, J. : Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor - β , *J. Biol. Chem.*, 262 : 6443-6446, 1987.
 21. Canalis, E. : Effect of platelet-derived growth factors on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, *Metabolism*, 30 : 970-975, 1981.
 22. Matsuda, N., Lin, W-L., Kumar, N. M.,

- Cho, M. I. and Genco, R. J. : Mitogenic, chemotactic and synthetic response of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, *J. Periodontol.*, 63 : 515-525, 1992.
23. Canalis, E. : Effect of Insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, *J. Clin. Invest.*, 66 : 709-719, 1980.
24. Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian R. K., Smith, S. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H. and Fauci, A. S. : Transforming growth factor type - beta : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 : 4167-4171 : 1986.
25. Roberts, A. B., Frolik, C. A., Anzano, M. A. and Sporn, M. B. : Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues, *Fed. Proc.* 42 : 2621-2626, 1983.
26. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M. and Sporn, M. B. : New class of transforming growth factor potentiated by epidermal growth factor : isolation from non-neoplastic tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 78 : 5339-5343, 1981.
27. Derynck R. : Transforming growth factor - alpha : Structure and biological activities, *J. Cell Biochem.*, 32 : 293-304 : 1986.
28. Burgess, A.W.: Epidermal growth factor and transforming growth factor - alpha, In : Waterfield MD, ed. *Growth factors*, *Br. Med. Bull.*, 45 : 401-424 : 1981.
29. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L. M., Roche, N. S., Stern, D. F. and Sporn, M. B.: Type β transforming growth factor : A bifunctional regulator of cellular growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 : 119-123, 1985.
30. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M. and Assoian, R. K.: Transforming growth factor - β : Biological function and chemical structure, *Science*, 233 : 532-534, 1986.
31. Seyedin, S. M., Thompson, A. Y. and Bertz, H. : Cartilage inducing factor : Apparent identity to transforming growth factor - β , *J. Biol. Chem.*, 261 : 5693-5695, 1986.
32. Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M. and Sporn, M. B. : Transforming growth factor - β in human platelets : identification of a major storage site, purification and characterization, *J. Biol. Chem.*, 258 : 7155-7160 : 1983.
33. 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.
34. Noda, M. and Camilliere, J. J.: In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor - β : *Endocrinol.*, 124 : 2991-2994, 1989.
35. Joyce, M. E., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Bolander M. E.: Transforming growth factor - β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur, *J. Cell Biol.*, 110 : 2195-2207 : 1990.
36. Sporn, M. B. Roberts, A. B., Wakefield, L. M. and de Crombrughe, B. : Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor - beta, *J. Cell Biol.*, 105 : 1039-1045, 1987.

37. Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J. : Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β 1 and concanavalin A : Regulation of matrix metalloproteinases and TIMP, *J. Periodont. Res.*, 26 : 279-282, 1991.
38. Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J.: Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase / type IV collagenase by transforming growth factor - β 1 in human fibroblasts : comparison with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression, *J. Biol. Chem.*, 266 : 14064-14071, 1991.
39. Fine, A. and Goldstein, R. H. : The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, 262 : 3897-3902, 1987.
40. Pfeilschifter, J., D'Souza, S. M. D. and Mundy, G. R. : Effects of transforming growth factor - β on osteoblastic osteosarcoma cells, *Endocrinol.*, 121 : 212-218, 1987.
41. Pfeilschifter, J., Seyedin, S. M. and Mundy, G. R. : Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures, *J. Clin. Invest.*, 82 : 680-685, 1988.
42. Pfeilschifter, J., Wolf, O., Naumann, A., Minne, H. W., Mundy, G. R. and Ziegler, R. : Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor β , *J. Bone Min. Res.*, 5 : 825-830, 1990.
43. Mundy, G. R. and Bonewald, L. F. : Role of TGF β in bone remodeling, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 593 : 91 - 97, 1990.
44. Bonewald, L. F. and Mundy, G. R. : Role of transforming growth factor - beta in bone remodeling, *Clin. Ortho. Rel. Res.*, 250 : 261-276, 1990.
45. 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.
46. Dennison, D. K., Vallone, D. R., Pinero, G. J., Rittman, B. and Caffesse, R. G. : Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts, *J. Periodontol.*, 65 : 641-648, 1994.
47. 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, *Biochem.*, 10 : 988-994, 1971.
48. Peterkofsky, B. and Prater, W. D. : Increased collagen synthesis in Kirsten sarcoma virus transformed BALB373 cells grown in the presence of dibutyryl cyclic AMP, *Cell*, 3 : 291-299, 1974.
49. Melcher, A. H. : On the repair potential of periodontal tissue, *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
50. Centrella, M., McCarthy, T. L. and Canalis, E. : Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast - enriched cell cultures from fetal rat bone, *J. Biol. Chem.*, 262 : 2869-2874, 1987.
51. Wrana, J. L., Sodek, J., Ber, R. L. and Bellows, C. G. : The effects of platelet - derived transforming growth factor β on normal human diploid gingival fibroblasts, *Eur. J. Biochem.*, 159 : 69-76, 1986.
52. Caffesse, P. G., Quinn, C. R. : Polypeptide growth factors and attachment

- proteins in periodontal wound healing and regeneration, *Periodontol.* 2000, 1 : 69-79, 1993.
53. Bornstein, P. : Structurally distinct collagen types, *Ann. Rev. Biochem.*, 49 : 957-1003, 1980.
54. Alvares, O., Klebe, R., Grant, G. and Cochran, D. L. : Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells, *J. Periodontol.*, 662 : 552-558, 1995.
55. Kawamoto, T., Sato, J. D., Le, A., Polikoff, J., Sato, G. and Mendelsohn, J. : Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor : Identification of high-affinity anti-receptor monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80 : 1337-1341, 1983.
56. 손성배, 서조영, 박준봉 : 치은섬유아세포와 치주인대세포의 세포성장에 관한 비교, *대한치주과학회지*, 21 : 286-302, 1991.

The Effect of the Transforming Growth Factor- β on Collagen Synthetic Activity of the Human Periodontal Ligament Cells and Human Gingival Fibroblasts

Mi-Jeong Kim, Jae-Mok Lee, Jo-Young Suh

Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyungpook National University

Transforming growth factor - β is one of the polypeptide growth factors that mediate the activity of mesenchymal cells and regulate wound healing process via cell proliferation, migration and extracellular matrix formation.

The purposes of this study is to evaluate the effects of transforming growth factor - β on the protein synthetic activity of human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts. The cells which were prepared were primary cultured gingival fibroblasts and periodontal ligament cells from humans, and the fourth or sixth subpassage were used in the experiments. Cells were seeded and at a confluent state, 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ng/ml TGF- β and $2\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] proline were added to the cells and cultured for 24 hours. Then, 1 and 5 ng/ml concentrations were selected and added to confluent cells and cultured for 24 and 48 hours. They were labeled with $2\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] proline for 24 hours and a collagen assay was done by the Peterkofsky and Diegelman method. The results were presented as the mean disintegration per minute (dpm) per well and S.D. of four determinations.

The results were as follows. :

The total protein, collagen and noncollagenous protein synthesis in periodontal ligament cells and gingival fibroblasts were increased dose- dependently by transforming growth factor- β to 2.5-5 ng/ml concentration and decreased at 10 ng/ml concentration. The percent of collagen was slightly changed according to the concentration of transforming growth factor- β . The effect of transforming growth factor- β was not specific for collagen synthesis since it increased the total, noncollagenous and collagenous protein, simultaneously.

In the comparison of protein synthetic activity between the human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts, the human gingival fibroblasts had higher activities than the human periodontal ligament cells at all times and concentrations of TGF- β .

In the comparison of protein synthetic activity between the 24 hour effect and the 48 hour effect of TGF- β , the 48 hour cultured cells' synthetic activity decreased more than the 24 hour cultured cells at human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts.

In conclusion, TGF- β has important roles in the stimulation of protein synthesis in human periodontal

ligament cells and human gingival fibroblasts.

Thus, it may be useful for clinical application in periodontal regenerative procedures.