

## TGF- $\beta$ 1이 Minocycline을 전처리한 사람 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

양승오 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

### I. 서론

치주염은 백혈구의 침윤, 결합조직의 소실, 치조골의 흡수, 그리고 치주낭의 형성 등을 특징으로 하는 만성 염증성 질환으로<sup>1)</sup> 손상된 치주조직의 재생은 외과적 치주치료의 중요한 목표이며, 외과적 처치에 의한 치근면에 대한 결합조직의 재부착에 관하여 많은 연구가 시행되어 왔다. 그러나 다양한 치료법에도 불구하고 완전한 재부착을 얻는데에는 많은 어려움이 있었는데, 그 주된 실패요인은 독성 물질 특히 내독소에 의한 백악질의 감염<sup>2, 3)</sup> 및 접합상피의 근단측 이동으로 인한 결합조직의 재부착의 방해 때문이다. 특히 결합조직에 의한 재부착이 아닌 긴 접합상피로 치유된다는 사실이 Caton등<sup>4)</sup>과 Polson<sup>5)</sup>에 의해 보고되면서 새로운 치주낭의 형성에 의한 재발을 우려하였다.

따라서 치주치료후에 상피의 하방증식과 치태축적을 차단함으로써 기대할 수 있는 이상적인 치유 형태는 시술 후 치유 초기단계에서 결손부 주위의 치주인대로부터 유래된 세포가 치근면에 먼저 이주 증식하며, 이들 세포내의 교원섬유와 기질이 합성되는 동시에 신생 백악질 형성으로 치면과 재생골에 교원섬유가

함입되는 신부착이 형성되는 것이라고 할 수 있다<sup>6)</sup>. 이와 관련하여 치주인대세포의 치근면에 대한 부착을 촉진시키기 위한 보조적 수단으로서 치주질환으로 인해 노출된 치근표면을 변화시켜주는 방법들에 관한 연구가 진행되어 왔다. 예를 들어 구연산을 이용하여 치아를 탈회시키거나<sup>7, 8)</sup> fibronectin을 도포하거나<sup>9)</sup> 또는 두 가지를 병행하여<sup>10, 11)</sup> 섬유아세포의 재부착을 유도하고자 하였다. 또한 tetracycline을 국소적으로 도포하여 치아를 탈회시키는 효과를 이용하여 치주조직의 재생을 기대하였다<sup>12)</sup>. Tetracycline에는 항균효과<sup>13)</sup>, 교원질 분해효소 활성의 저해효과<sup>14)</sup>, 부갑상선 호르몬과 관련된 골흡수의 저해효과<sup>14)</sup>, 치근면을 탈회시키는 능력<sup>12)</sup> 및 섬유모세포에 직접 작용하여 세포 부착과 전개를 증진시키는 능력<sup>15)</sup> 등이 있다고 보고되어 왔다. Tetracycline 계열의 항생제 중 minocycline은 작용기전이 tetracycline과 유사하고 국소적 및 전신적으로 투여시 치태형성을 효과적으로 억제하며, 소량의 투여에도 불구하고 tetracycline에 비해 치은열구액내의 약제 농도가 높게 유지된다고 보고되었다<sup>16)</sup>. 또한 minocycline은 tetracycline보다 항균효과가 높고 내성균의 출현 비율이 낮다고 보고되었으며<sup>17)</sup>, 섬유모세포에 대한 부착효과가 tetracycline보

다 우수하다고 알려져 있다<sup>15)</sup>.

완전한 신부착을 위해서는 치근면에 부착된 치주인대 세포의 빠른 증식이 필요하다. 이와 관련하여 최근 신부착을 유도하는데 있어 또 다른 시도가 행해지고 있는데 이는 성장인자(growth factor)를 이용한 치주인대세포의 이주, 부착 및 증식의 도입이다<sup>16)</sup>. 이러한 성장인자중 platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF), transforming growth factor(TGF), epidermal growth factor(EGF) 및 bone morphogenic protein(BMP) 등이 치주상 치유에 있어 중요한 역할을 담당한다.

TGF- $\beta$ 는 25kDa의 분자량을 가진 dimeric polypeptide로 골과 혈소판에서 생산되고<sup>19), 20), 21)</sup>, 세포복제와 분화의 주요한 조절인자로 이기작용성 또는 다면발현성으로 작용하여 세포 성장을 촉진시키거나 억제시킬 수 있다<sup>22), 23)</sup>. TGF- $\beta$ 는 세포종류에 따라 다양한 효과를 보이는데, 상피세포의 증식을 억제하고 간엽세포의 증식을 촉진시킴이 보고되었다<sup>23), 24)</sup>. 또한 섬유모세포의 화학주성 능력과 증식을 자극하며, 세포외기질의 생성을 유도한다<sup>25), 26)</sup>. TGF- $\beta$ 는 배양조건에 따라 조골세포 증식에 촉진과 억제의 상반된 효과를 보이며<sup>27), 28), 29)</sup> 또한 PDGF, IGF 및 FGF 등의 다른 성장인자와 함께 작용시 상승작용을 보이는 것으로 알려져 있다<sup>30)</sup>.

TGF- $\beta$ 는 일반적으로 인체 골아세포의 미약한 분열 유발인자로 작용한다<sup>31)</sup>. Kells등<sup>32)</sup>은 정상적인 인체 골아세포에는 TGF- $\beta$ 의 수용기가 존재하며, 골유래세포에서 분열 유발인자로 작용한다고 하였다. 또한 TGF- $\beta$ 는 골아세포에 대해 화학주성을 유발하기도 한다<sup>33), 34)</sup>. 한편 Matsuda등<sup>35)</sup>은 TGF- $\beta$ 가 치유중인 발치와 옹괴로부터 유래된 치주인대세포에 대한 분열 유발인자로 작용하지 않으며 실제로는 분열 능력을 억제한다고 하였다. 그러나 Oates등<sup>36)</sup>은 TGF- $\beta$ 가 PDGF보다는 약하지만 인체

치주인대세포의 분열 유발인자로 작용한다고 보고하였다. 생체내 실험에서 TGF- $\beta$ 는 육아 조직의 생성을 증가시킨다<sup>36), 37), 38)</sup>. Lynch등<sup>39)</sup>은 돼지의 표피 창상부에 TGF- $\beta$ 를 적용시 재생피화가 억제되고 결체조직의 부피가 증가되며 교원질 합성 및 혈관생성이 촉진된다고 하였다.

본 연구는 치주인대세포의 부착을 촉진하는 것으로 알려진 minocycline을 이용하여 치주인대세포의 세포부착을 촉진시키고 90분 후에 TGF- $\beta$ 1을 처리하여 세포증식을 촉진시키는 것이 가능한지를 평가하고, minocycline과 TGF- $\beta$ 1 단독처리시와도 상호 비교하여 세포 활성을 증진시키는데 가장 좋은 조건을 찾아 임상에서의 이용가능성을 알아보려고 시행하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 재 료

#### ① 치주인대세포의 배양

치주인대세포는 교정치료를 위하여 발거한 소구치나 매복된 제3대구치의 치주인대로부터 얻었다. 간단히 설명하면, 발거한 치아를 HBSS(Hank's balanced salt solution, GIBCO/BRL, USA)로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거하였다. 세척한 치아를 100mm 조직배양용 접시에 옮기고 15번 blade를 이용하여 우태아 혈청(GIBCO/BRL, USA) 10%와 항생제(Penicillin G 10,000 units/ml, Streptomycin 10,000 $\mu$ g/ml 및 Amphotericin B 25 $\mu$ g/ml, GIBCO/BRL, USA) 1%를 포함한  $\alpha$ -MEM(mimimum essential medium, GIBCO/BRL, USA) 내에서 치근 중간 1/3에 있는 치주인대조직을 분리한 후 이들을 1 mm<sup>2</sup>으로 세절하여 60 mm 조직배양용 접시에 5~6개의 조각을 위치시켰다. 그 후 약 30분간 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 습도 100%의 배양기에서 배양

접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양 시킨 후, 각 배양접시당 10% 우태아 혈청과 1% 항생제가 첨가된  $\alpha$ -MEM 3ml씩을 첨가하고, 단일세포층이 형성될 때까지 2~3일 간격으로 배양액을 교환하면서 계대배양을 실시하였다. 치주인대 세포성분중 전형적인 섬유모세포의 형태를 보이는 plate를 선택하여 사용하였다. 본 실험은 5~8회 계대배양된 치주인대세포를 이용하였다.

## 2. 방법

### ① 세포부착

5~8회 계대배양한 단일세포층의 치주인대세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당  $1.5 \times 10^4$ 의 세포를 분주하였다. 0, 20 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  minocycline (Sigma chemical company, USA)을 배양액에 첨가하고, 1.5, 3 및 6시간 동안 세포 배양을 실시하였다. 본 실험에서는 20 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  minocycline을 사용하였다. 사용된 농도는 Gomes<sup>32)</sup> 등의 20~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 organ culture시 부갑상선 호르몬과 연관된 골흡수가 억제된다는 연구결과와 Somerman 등의 연구에서 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 부착이 증진되기 시작하고 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최대의 세포부착을 보인다는 결과에 기초하여 설정하였다. 탈락한 세포를 제거하기 위해 배양액을 제거한 다음 각 well에 1ml의 HBSS를 첨가하고, 독립현미경 (Model IMT-2-21, Olympus, Tokyo, Japan)에 부착되어 있는 사진기 (Model C-35AD-4, Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 사진을 촬영하고 HBSS를 제거하였다. 또한 세포를 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수를 혈구계수기를 이용하여 측정하였고, 실험은 6회 반복하여 시행하였다.

### ② 치주인대세포 활성화도 측정

5~8회 계대배양한 단일세포층의 치주인대

세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당  $1 \times 10^4$ 의 세포를 분주한 후 0, 20 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  minocycline이 함유된 배양액에서 1.5시간 동안 세포배양을 실시하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 HBSS로 1회 세척한 다음 1과 10  $\text{ng}/\text{ml}$  TGF- $\beta$ 1 (Sigma Co., L.O., USA)이 함유된 배양액으로 1 및 2일 동안 세포배양을 실시하였다. minocycline 처리시에는  $\alpha$ -MEM에서 배양한 세포를 대조군으로 하였고, minocycline 과 TGF- $\beta$ 1을 연속 처리시에는 4mM HCl이 함유된  $\alpha$ -MEM에서 배양한 세포를 대조군으로 사용하였다. 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배양액을 제거하고, 새 배양액 1ml을 각 well에 첨가하였다. 이어서 24-well plate에 부착되어 있는 세포의 양을 알아보기 위해 생리식염수에 용해한 MTT용액 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide : Sigma Co., L.O., USA) 200  $\mu\text{l}$ 을 각 well에 첨가한 후 3시간 동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 200  $\mu\text{l}$ 의 DMSO (dimethyl sulfoxide, 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., Tokyo, Japan)로 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포활성도는 대조군의 백분율로 산출하였고, 각 실험은 4회 반복하여 실시하였다.

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

### ③ 치주인대세포 증식도 검사

5~8회 계대배양한 치주인대세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당  $1 \times 10^4$ 의 세포를 분주한 후 0, 20 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  minocycline이 함

유된 배양액에서 1.5시간 동안 세포배양을 실시하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 HBSS 1회 세척한 다음 1 및 10ng/ml TGF- $\beta$ 1이 함유된 배양액으로 1일 및 2일 동안 세포배양을 실시하였다. Minocycline 처리시에는  $\alpha$ -MEM에서 배양한 세포를 대조군으로 하였고, minocycline 과 TGF- $\beta$ 1을 연속처리시에는 4 mM HCl 이 함유된  $\alpha$ -MEM에서 배양한 세포를 대조군으로 사용하였다. 배양 마지막 2시간 전에 배양액을 제거하고, 1 $\mu$ Ci/ml의  $^3$ H-thymidine ([methyl- $^3$ H] thymidine, TRK 758, 5 mCi, Amersham Co., U.K.)이 함유된 배양액으로 두시간 동안 세포배양을 실시하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 냉 4% PBS(phosphated buffered saline)로 3회 반복하여 세척한 다음 5% TCA(trichloroacetic acid) 용액으로 4회 반복처리하였다. 각 well에 0.1% NaOH/ 0.1% SDS 500 $\mu$ l를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 250 $\mu$ l을 채취하여 liquid scintillation counter(LS5000 Analyzer, Version3.1-A, Beckman instruments, USA)로 세포 DNA내로 편입된 방사선량을 측정하였고, 각 실험은 4회 반복하여 시행하였다.

#### ④ 치주인대세포의 총단백질 합성 및 교원질 합성능 측정<sup>4)</sup>

5~8회 계대배양한 치주인대세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당  $1 \times 10^4$ 의 세포를 분주한 후 0, 20 및 100 $\mu$ g/ml minocycline이 함유된 배양액에서 1.5시간 동안 세포배양을 실시하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 HBSS

1회 세척한 다음 1 및 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1이 함유된 배양액으로 1일 및 2일 동안 세포배양을 실시하였다. Minocycline 처리시에는  $\alpha$ -MEM에서 배양한 세포를 대조군으로 하였고, minocycline 과 TGF- $\beta$ 1을 연속처리시에는 4 mM HCl 이 함유된  $\alpha$ -MEM에서 배양한 세포를 대조군으로 사용하였다. 실험기간 마지막 4시간 전에 3 $\mu$ Ci/ml의  $^3$ H-proline(L-[5- $^3$ H] proline, TRK 323, 1 mCi, Amersham Co., U.K.)을 첨가하고 4시간동안 세포배양한 다음 배양액을 제거하였다. Trypsinization한 다음 1,400 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 0.5ml 증류수를 첨가하고, 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 용해시켰다. 여기에 0.5 ml의 냉 20% TCA/2mM proline을 첨가하고, 0 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 1,000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 0.4ml의 0.2N NaOH를 첨가하였다. Eppendorf tube에 0.2ml의 시료를 나누어 넣고 각 tube에 0.15ml의 0.15 N HCl, 1 M HEPES buffer(pH 7.2), protease inhibitor I(Aminocaproic acid, N-ethylmaleimide), protease inhibitor II(Phenylmethyl sulfonyl fluoride, pepstatin) 및 CaCl $_2$  등을 넣고 교원질을 측정하기 위한 tube에는 collagenase type VII (Sigma Co., L.O., USA) 15U를 첨가하고, 총 단백질량을 측정하기 위한 tube에는 collagenase를 첨가하지 않고 37 $^{\circ}$ C 진탕수욕조에서 90분간 배양하였다. 각 tube에 0.5ml의 냉 10% TCA/ 0.5% tannic acid를 첨가하고 0 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 1,000rpm으로 5분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 상층액

Total protein=noncollagenous protein+collagenous protein

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

PCS : percent collagen synthesis (%)

dpm : disintegration per minute

표 1. Effect of minocycline on attachment of periodontal ligament cells

hour concentration( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1.5	3	6
0(control)	$6.83 \times 10^3 \pm 1.22 \times 10^3^{**}$	$12.17 \times 10^3 \pm 1.49 \times 10^3$	$14.38 \times 10^3 \pm 1.48 \times 10^3$
20	$8.80 \times 10^3 \pm 1.20 \times 10^3^*$	$11.65 \times 10^3 \pm 1.32 \times 10^3$	$13.88 \times 10^3 \pm 1.02 \times 10^3$
100	$9.77 \times 10^3 \pm 1.70 \times 10^3^*$	$12.95 \times 10^3 \pm 1.49 \times 10^3$	$14.00 \times 10^3 \pm 0.94 \times 10^3$

\* : Significantly different from the control( $P < 0.05$ )

\*\* : Data were expressed as mean(cell number)  $\pm$  S.D. of 6 determinations

과 collagenase를 처리한 tube의 침전물에 1ml의 0.2 N NaOH에 용해시킨 시료를 liquid scintillation counter에서 방사선량을 측정하여 아래의 공식으로 총 단백질량과 교원질 합성능을 산출하였다. 각 실험은 4회 반복하여 시행하였다.

### ⑤ 통계분석

통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 통계분석 하였다.

## III. 연구결과

### 1. Minocycline 처리가 치주인대세포의 부착에 미치는 영향

치주인대세포에 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline을 1.5시간 처리한 경우 치주인대세포의 부착은 대조군에 비해 유의하게 증가되었으며, 이는 농도의존적이었다. 이 후 시간이 지날수록 치주인대세포의 부착은 실험군과 대조군이 유사하였으며, 통계학적 유의성은 없었다(표 1).

또한 1.5시간동안 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline을 처리한 세포에서 세포돌기가 가장 많이 돌출되어 있었으며, 이 후 시간이 지날수록 대조군과 minocycline처리군 사이에서 세포형태의 차이는 발견되지 않았다 (Photo. 1~8).

### 2. 치주인대세포 활성도 측정

20 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline만을 처리한 세포군을 제외한 모든 세포군에서 치주인대세포의 세포증식은 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(표 2). 또한 각 농도의 minocycline을 1.5시간동안 처리하고 TGF- $\beta$ 1을 첨가하여 배양한 세포군에서는 대조군에 비해 모두 유의한 증가를 보였다. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline을 처리하고 1ng/ml의 TGF- $\beta$ 1을 처리한 세포군에서 TGF- $\beta$ 1 단독투여군보다 치주인대세포의 세포 증식이 약간 증가하는 경향을 보였다(표 2).

동일한 농도의 minocycline 투여군에서, TGF- $\beta$ 1 투여군은 TGF- $\beta$ 1 비투여군에 비해 1일 및 2일에서 모두 유의한 세포증식을 보였으나 TGF- $\beta$ 1의 농도에 따른 유의한 차이는 보이지 않았다(그림 1 및 그림 2). 또한 동일한 농도의 TGF- $\beta$ 1 투여군에서 minocycline의 투여농도에 따른 치주인대 세포의 세포증식은 차이를 보이지 않았다 (그림 1 및 그림 2).

### 3. 치주인대세포 증식도 검사

Minocycline을 투여하지 않고 1.5시간 동안 배양한 후 1 및 10 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1을 1일간 투여한 세포군은 대조군에 비해 DNA 합성이 증가하였다. 또한 20 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ml의

표 2. Effect of TGF- $\beta$ 1 on cell proliferation of minocycline-pretreated periodontal ligament cells

Day Groups	1	2
M0T0(control)	100.00 $\pm$ 7.55**	100.00 $\pm$ 6.05
M0T1	127.73 $\pm$ 3.46*	119.50 $\pm$ 0.78*
M20T10	127.18 $\pm$ 0.98*	118.88 $\pm$ 0.67
M20T0	106.75 $\pm$ 13.42	98.25 $\pm$ 8.55
M20T1	125.85 $\pm$ 7.76*	114.68 $\pm$ 6.78*
M100T10	128.23 $\pm$ 13.34*	116.50 $\pm$ 11.48*
M100T0	104.05 $\pm$ 11.37	108.05 $\pm$ 9.91
M100T1	129.38 $\pm$ 2.61*	121.43 $\pm$ 2.14*
M100T10	124.33 $\pm$ 9.14*	119.38 $\pm$ 3.43*

\* : Significantly different from the control (P<0.05)

\*\* : Data were expressed as mean(%)  $\pm$  S.D. of 4 determinations

M0T0 : No minocycline, No TGF- $\beta$ 1 application

M0T1 : No minocycline, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M20T10 : No minocycline, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M20T0 : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, No TGF- $\beta$ 1 application

M20T1 : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M100T10 : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M100T0 : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, No TGF- $\beta$ 1 application

M100T1 : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M100T10 : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

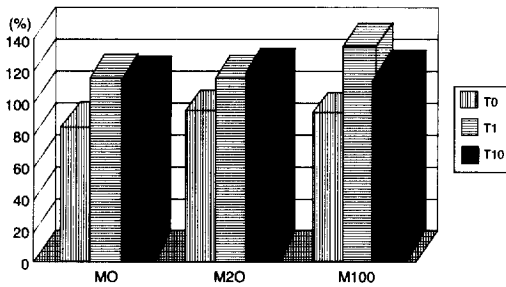


그림 1. Effect of TGF- $\beta$ 1 on cell proliferation in minocycline-pretreated periodontal ligament cell(1st day)

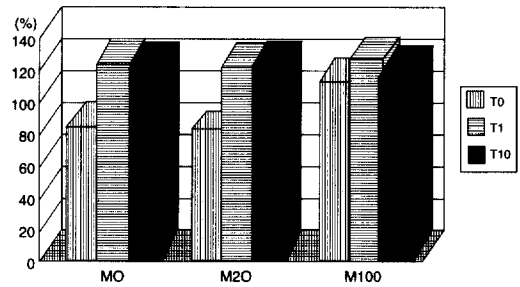


그림 2. Effect of TGF- $\beta$ 1 on cell proliferation in minocycline-pretreated periodontal ligament cell(2nd day)

minocycline을 투여한후 1.5시간 배양한 다음 1 및 10 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1을 투여한 세포군도 대조군에 비해 DNA합성이유의하게 증가하였다.

그러나 minocycline만을 투여한 세포군에서는 대조군에 비해 통계학적 유의성은 없었으나 DNA합성이 감소하는 경향을 보였다(표 3).

Minocycline을 투여하지 않고 1ng/ml과 10ng/ml의 TGF- $\beta$ 1만을 투여하고 2일간 배양한 세포군은 대조군에 비해 현저히 DNA 합성이 증가하였으며, 20  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml의 minocycline을 투여한 후 TGF- $\beta$ 1을 투여한 경우에도 DNA 합성이 유의하게 증가하였다. 또한 20  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml의 minocycline만을 처리한 군에서는 대조군에 비해 DNA 합성이 유의하게 감소하였다(표 3)

그림 3과 그림 4는 각각 1 및 2일간의 DNA 합성량을 그린 도표로서 같은 농도의 minocycline 투여군에서, TGF- $\beta$ 1 투여군이 TGF- $\beta$ 1 비투여군보다 DNA 합성이 현저하게 증가

하였으며, 특히 2일군에서는 동일한 농도의 TGF- $\beta$ 1 투여군에서 minocycline 투여농도가 높을수록 DNA 합성이 감소됨이 관찰되었다.

#### 4. 치주인대세포의 총단백질 합성

1일군에서 1 및 10ng/ml의 TGF- $\beta$ 1만을 투여한 군과 100  $\mu$ g/ml의 minocycline만을 투여한 군 및 100  $\mu$ g/ml의 minocycline을 처리하고 1.5 시간 후에 10 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1을 처리한 군의 총단백질 합성능은 대조군에 비해 유의한 감소를 보였고, 다른 군들은 대조군과 비슷하거나 약간 감소되는 경향을 보였다 (표 4).

표 3. Effect of TGF- $\beta$ 1 on [3H]-thymidine incorporation of minocycline-pretreated periodontal ligament cells

Day Groups	1	2
M <sub>0</sub> T <sub>0</sub> (control)	100.00 ± 10.22**	100.00 ± 6.75
M <sub>0</sub> T <sub>1</sub>	178.73 ± 21.13*	169.48 ± 22.08*
M <sub>20</sub> T <sub>10</sub>	148.70 ± 8.45*	202.08 ± 30.20
M <sub>20</sub> T <sub>0</sub>	81.23 ± 6.24	75.95 ± 6.99
M <sub>20</sub> T <sub>1</sub>	158.93 ± 25.09*	139.83 ± 13.15*
M <sub>100</sub> T <sub>10</sub>	132.50 ± 36.95*	151.08 ± 7.64*
M <sub>100</sub> T <sub>0</sub>	85.80 ± 3.32	59.10 ± 3.79
M <sub>100</sub> T <sub>1</sub>	175.40 ± 3.21*	118.13 ± 9.58*
M <sub>100</sub> T <sub>10</sub>	152.00 ± 10.82*	130.48 ± 7.72*

\* : Significantly different from the control (P < 0.05)

\*\* : Data were expressed as mean(%) ± S.D. of 4 determinations

M<sub>0</sub>T<sub>0</sub> : No minocycline, No TGF- $\beta$ 1 application

M<sub>0</sub>T<sub>1</sub> : No minocycline, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>20</sub>T<sub>10</sub> : No minocycline, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>20</sub>T<sub>1</sub> : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, No TGF- $\beta$ 1 application

M<sub>20</sub>T<sub>1</sub> : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>100</sub>T<sub>10</sub> : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>100</sub>T<sub>0</sub> : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, No TGF- $\beta$ 1 application

M<sub>100</sub>T<sub>1</sub> : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>100</sub>T<sub>10</sub> : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

표 4. Effect of TGF- $\beta$ 1 on total protein synthesis of minocycline-pretreated periodontal ligament cells

Day Groups	1	2
M0T0(control)	904.35 $\pm$ 353.98**	607.58 $\pm$ 64.15
M0T1	487.95 $\pm$ 108.63*	2459.80 $\pm$ 423.58*
M0T10	561.50 $\pm$ 87.36*	2452.35 $\pm$ 333.68*
M20T0	911.63 $\pm$ 104.53	1585.40 $\pm$ 184.79*
M20T1	749.20 $\pm$ 33.62	2378.00 $\pm$ 200.99*
M100T10	1008.70 $\pm$ 279.50	2996.65 $\pm$ 659.02*
M100T0	625.80 $\pm$ 119.06*	1478.05 $\pm$ 502.07
M100T1	640.10 $\pm$ 119.44	1090.07 $\pm$ 264.47*
M100T10	569.70 $\pm$ 39.33*	1358.73 $\pm$ 355.31*

\* : Significantly different from the control (P < 0.05)

\*\* : Data were expressed as mean(dpm)  $\pm$  S.D. of 4 determinations

M0T0 : No minocycline, No TGF- $\beta$ 1 application

M0T1 : No minocycline, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M0T10 : No minocycline, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M20T0 : 20  $\mu$ g/ml minocycline application,

M20T1 : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M100T10 : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M100T0 : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, No TGF- $\beta$ 1 application

M100T1 : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M100T10 : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

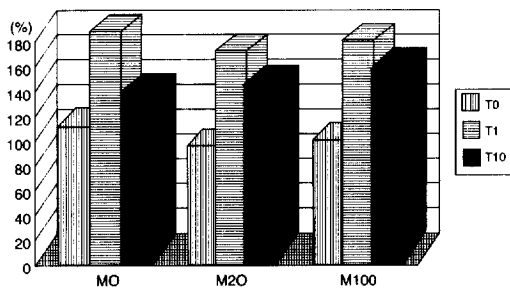


그림 3 Effect of TGF- $\beta$ 1 on  $^3$ H-thymidine incorporation in minocycline-pretreated periodontal ligament cell(1st day)

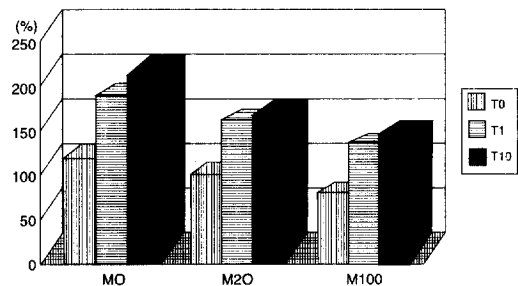


그림 4 Effect of TGF- $\beta$ 1 on  $^3$ H-thymidine incorporation in minocycline-pretreated periodontal ligament cell(1st day)

2일군에서는 100  $\mu$ g/ml의 minocycline을 투여한 후 1 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1을 투여한 군을 제외한 모든 실험군에서 총단백질의 합성은 대조

군보다 유의하게 증가하였다 (표 4).

1일군의 minocycline 비투여군에서 1 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1 투여군의 총단백질 합성은 TGF- $\beta$ 1



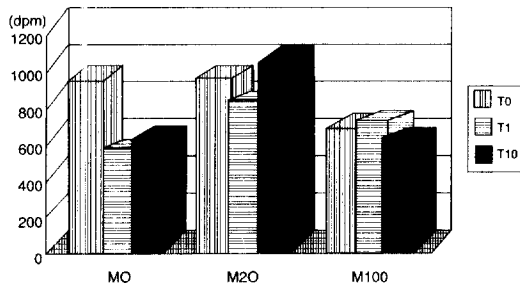


그림 5. Effect of TGF- $\beta$ 1 on total protein synthesis in minocycline-pretreated periodontal ligament cells(1st day)

비투여군에 비해 유의하게 감소되었으며, 20 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline 투여군에서는 TGF- $\beta$ 1의 농도에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다. 동일한 농도의 TGF- $\beta$ 1 투여군에서 minocycline 농도에 따른 변화를 보면 1 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1 투여군에서 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline 투여군이 minocycline비투여군에 비해 유의한 증가가 나타났고, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1을 투여한 실험군에서는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  minocycline 투여군이 minocycline을 투여하지 않은 군이나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 투여한 군에 비해 유의한 단백질 합성능의 증가를 보였다 (그림 5).

2일군에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  minocycline 투여군을 제외한 1 ng/ml 및 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 투여군이 TGF- $\beta$ 1을 투여하지 않은 군보다 단백질 합성이 유의하게 증가하였다. 또한 1ng/ml과 10ng/ml 농도의 TGF- $\beta$ 1을 처리한 경우 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline으로 전처리한 군이 minocycline을 처리하지 않은 군보다 유의한 감소를 보였고, TGF- $\beta$ 1을 처리하지 않은 군에서는 minocycline을 전처리한 군이 minocycline을 전처리하지 않은 군보다 유의한 증가를 보였다 (그림 6).

### 5. 치주인대세포의 교원질 합성능 측정

표 5는 총단백질 합성능중 교원질이 차지하

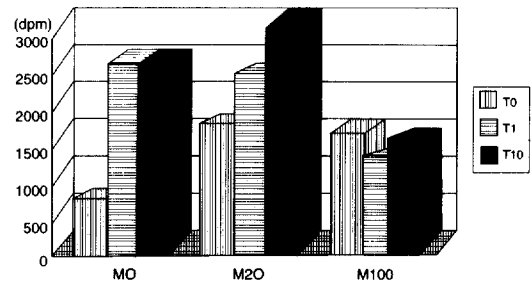


그림 6. Effect of TGF- $\beta$ 1 on total protein synthesis in minocycline-pretreated periodontal ligament cells(1st day)

는 비율을 나타낸 것으로서 1일군의 경우는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline으로 전처리하고 1 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1을 처리한 군만이 대조군에 비해 유의한 교원질 합성능의 증가를 보였고 다른 군에서는 대조군과 유사한 수준을 보였다. 2일군에서는 모든 실험군이 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다(표 5).

1일군에서는 minocycline으로 전처리하지 않고 1ng/ml TGF- $\beta$ 1 투여군에서 TGF- $\beta$ 1을 처리하지 않은 군보다 교원질의 낮은 합성을 보였다. 또한 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 투여군에서는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline을 처리한 것이 minocycline으로 전처리하지 않은 군에 비해 매우 높은 교원질 합성을 보였다(그림 7).

2일군에서는 minocycline으로 전처리하지 않은 군중에서 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 투여군이 TGF- $\beta$ 1을 처리하지 않은 군보다 유의한 교원질 합성능의 감소를 보였고, 동일한 TGF- $\beta$ 1 농도의 각군에 대해서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline으로 전처리한 군이 minocycline을 사용하지 않은 군보다 낮은 교원질 합성능을 보였다 (그림 8).

## N. 총괄 및 고찰

치주치료의 목적은 조직에 확산된 염증을 제거하고, 질환으로 인하여 소실된 치주조직

표 5. Effect of TGF- $\beta$ 1 on percent collagen synthesis of minocycline-pretreated periodontal ligament cell

Day Groups	1	2
M <sub>0</sub> T <sub>0</sub> (control)	5.33±0.75	32.37±8.35
M <sub>0</sub> T <sub>1</sub>	4.00±0.53	23.64±7.00*
M <sub>0</sub> T <sub>10</sub>	5.42±0.84	17.99±5.05*
M <sub>20</sub> T <sub>0</sub>	5.70±1.16	17.74±4.79*
M <sub>20</sub> T <sub>1</sub>	7.28±0.74	23.06±3.01*
M <sub>100</sub> T <sub>0</sub>	4.21±1.75	20.45±6.52*
M <sub>100</sub> T <sub>1</sub>	8.19±5.35	9.45±3.34*
M <sub>100</sub> T <sub>1</sub>	15.77±9.36*	8.12±2.97*
M <sub>100</sub> T <sub>10</sub>	6.83±1.36	7.58±3.47*

\* : Significantly different from the control (P < 0.05)

\*\* : Data were expressed as mean(%) ± S.D. of 4 determinations.

M<sub>0</sub>T<sub>0</sub> : No minocycline, No TGF- $\beta$ 1 application

M<sub>0</sub>T<sub>1</sub> : No minocycline, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>0</sub>T<sub>10</sub> : No minocycline, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>20</sub>T<sub>0</sub> : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, No TGF- $\beta$ 1 application

M<sub>20</sub>T<sub>1</sub> : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>100</sub>T<sub>0</sub> : 20  $\mu$ g/ml minocycline application, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>100</sub>T<sub>0</sub> : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, No TGF- $\beta$ 1 application

M<sub>100</sub>T<sub>1</sub> : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

M<sub>100</sub>T<sub>10</sub> : 100  $\mu$ g/ml minocycline application, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 application after 1.5 hour

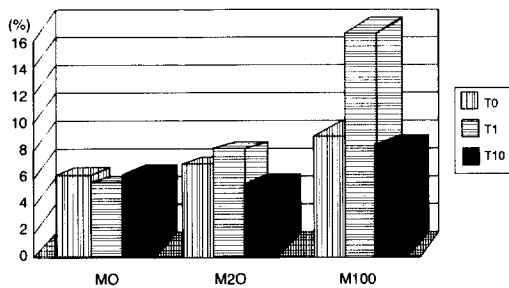


그림 7. Effect of TGF- $\beta$ 1 on percent collagen synthesis in minocycline-pretreated periodontal ligament cell(1st day)

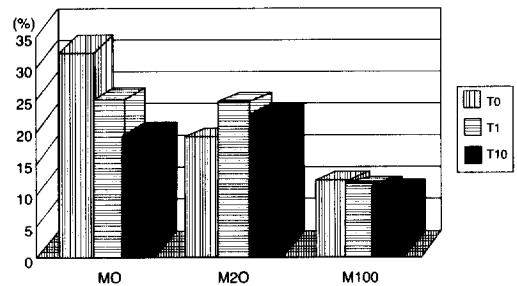


그림 8. Effect of TGF- $\beta$ 1 on percent collagen synthesis in minocycline-pretreated periodontal ligament cell(1st day)

의 재생을 유도하는 과정 즉 치조골 및 백악질의 형성과 이를 피개하는 결합조직 부착을 형성하여 궁극적으로는 치주낭의 재형성을 막

아 치주질환의 재발을 예방하는 것이다<sup>6)</sup>. 치주조직의 재생에 관여하는 세포로는 치은 상피세포, 치은 결합조직 세포, 골세포, 치주인대

세포 등이 있다. 이들 세포중 Bower등<sup>41)</sup>은 치은 섬유아세포가 치주조직 재생에 주로 관여한다고 주장한 바 있으나 Bokyo등<sup>42)</sup>은 치은 결체조직 세포와 치조골 세포가 치근면과 직접 접촉하였을 경우에는 치근 흡수와 골성 강직을 초래한다고 주장하였고, Stahl<sup>43)</sup>은 치은 상피세포의 빠른 증식에 의해 치주낭 내면에 재생피화가 일어나면 치근 흡수와 골성 강직을 동시에 예방할 수 있으나 치주낭의 재형성 가능성이 높다고 주장하였다. 이와는 달리 Melcher<sup>44), 45)</sup> 와 Isidor<sup>46)</sup>는 치주인대에서 유래된 치주인대세포가 치근면과 접촉하여 새로운 백악질이 형성되며 기능적인 섬유 배열을 가진 치주인대의 재생이 일어나 바람직한 치유 형태가 나타난다고 보고하였다. 치주인대세포는 고도로 조직화된 cellular organelle을 지닌 고도의 cellular polarization을 보이며<sup>47), 48)</sup>, 높은 교원질 합성율을 보이고, 신생 교원질 분자의 중합에 효과적이며<sup>49)</sup>, 조골기능을 가지며<sup>50), 51), 52)</sup>, 백악질 생성에 관여하는 기능을 갖는다고 알려졌다. 치주창상의 치유는 구강 상피의 근단부 이동이 차단되어야 하며, 치주인대, 치조골세포 등에 의해 상실된 부착기구가 재생되어져야만 한다<sup>53)</sup>. 따라서 치주치료 후에 상피의 하방 증식과 치태축적을 차단함으로써 기대할 수 있는 이상적인 치유 형태는 시술 후 치유 초기단계에서 결손부 주위의 치주인대로부터 유래된 세포가 치근면에 먼저 이주 증식하며 이들 세포내의 교원섬유와 기질이 합성되는 동시에 신생백악질 형성으로 치면과 재생골에 교원섬유가 합입되는 신부착이 형성되는 것이라고 할 수 있다<sup>6)</sup>. 따라서 본 연구에서는 치주인대세포의 부착을 촉진하는 것으로 알려진 minocycline과 증식을 촉진하는 것으로 알려진 TGF- $\beta$ 1을 연속적으로 투여함으로써 치주인대세포의 활성을 평가하고자 하였다.

본 연구에서 사용한 minocycline은 tetracycline계열의 항생제로서 작용기전이 유

사하며, 국소적 및 전신적으로 투여시 치태형성을 효과적으로 억제하고, 소량 투여시에도 tetracycline에 비해 치은열구액내의 약제농도가 높게 유지된다는 Baker등<sup>16)</sup>의 연구보고, tetracycline보다 항균효과가 높고 내성균의 출현 비율이 낮게 나타난다는 Genco<sup>17)</sup>의 보고 및 섬유아세포에 대한 부착효과가 tetracycline보다 더 우수하다는 Somerman<sup>15)</sup> 등의 보고를 근거로 본 실험에 사용하였다.

Terranova등<sup>12)</sup>은 tetracycline을 실험실에서 mg단위로 투여한 경우 치근면에 대한 세포부착을 증진시킴을 보고하였다. 이러한 사실은 chelating agent로서의 tetracycline의 효과 즉 치근면을 탈회함으로써 간접적으로 세포부착을 증진시키는 것으로 설명하였으며, Wikesjö 등<sup>54)</sup>은 tetracycline을 치근면에 도포시 약제의 산도에 의한 치근면 탈회로 교원질이 노출되고, 노출된 교원질에 의해 상피세포의 근단 방향으로의 이동이 차단되며, 치은 섬유모세포의 부착이 촉진되었다고 보고하였다. 또한 Somerman 등<sup>15)</sup>은 minocycline이 섬유모세포에 직접 작용하여 세포의 부착도를 증진시킨다고 하였다.

성장인자에 대한 최근의 연구들에서 치주질환에 의해 파괴된 치주 조직의 재생에 성장인자가 보조적인 치료방법으로써 제공되었다. TGF- $\beta$ 1은 상피세포의 성장억제인자로 알려져 있고, 치주인대세포나 골아세포와 같은 중배엽 기원의 몇몇 세포형의 증식을 촉진함이 밝혀졌다<sup>(23), (35), (56), (57)</sup>. 치주조직의 재생을 위한 모델은 치주인대세포와 골아세포 유사세포의 촉진과 함께 상피세포와 치은 섬유모세포의 억제가 요구되는데 이는 TGF- $\beta$ 1으로 이루어질 수 있다. 이들 결과는 창상치유에 있어 TGF- $\beta$ 1의 적용을 지지하며 특히 골유도성의 잠재력에 의해 치주질환부에서의 사용이 추천된다.

Minocycline을 사용하여 치주인대세포의 부착을 관찰한 본 실험의 결과는 Somerman 등

과 강 등<sup>30)</sup>의 연구에서와 비슷한 결과를 보였는데 20 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml의 농도로 1.5시간 처리한 군에서 대조군에 비해 유의한 부착의 증가를 보이며 특히 100 $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 경우 최대의 부착을 보였다. 3시간과 6시간에서는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았고, 시간이 경과할수록 동일한 농도에서 점차로 실험군의 부착도와 대조군의 부착도 사이의 차이가 줄어들어 관찰할 수 있었다. 또한 세포형태의 관찰을 위해 촬영한 사진에서도 100 $\mu$ g/ml minocycline을 처리한 경우 1.5시간에서 다른 실험군에 비해 세포돌기의 모습이 비교적 뚜렷하게 나타났으며 시간이 지날수록 대조군 및 20 $\mu$ g/ml의 농도를 투여한 군과 비교하여 세포돌기 모습 사이의 차이가 점점 줄어들었다. 이는 1.5시간 후까지 세포가 교원질과 같은 부착 촉진물질이 바닥 표면에 처리된 배양접시에 90% 이상이 부착한다는 Klebe<sup>31)</sup>의 실험결과와 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.

세포증식을 알아보기 위한 MTT assay와 <sup>3</sup>H-thymidine assay의 결과는 TGF- $\beta$ 1만을 투여한 군에서는 대조군에 비해 유의한 세포증식을 나타내는 것으로 나타났으며, minocycline과 TGF- $\beta$ 1을 동시에 투여한 군 역시 대조군에 비해 유의한 증식을 보였다. 그러나 minocycline만을 투여한 군에서는 MTT assay에서는 대조군과 비슷한 수준으로 나타났으며, <sup>3</sup>H-thymidine assay에서, 특히 2일군에서는 minocycline만을 투여한 군에서는 세포활성의 유의한 감소를 보였다. 또한 minocycline과 TGF- $\beta$ 1을 연속투여한 군이 TGF- $\beta$ 1만을 단독으로 처리한 군에 비해 뚜렷한 세포증식을 보이지 않았다. 이러한 결과는 실험방법중 minocycline이 함유된 배지를 처리하고 1.5시간

후 배지를 제거하고 나서 1회 밖에 세척하지 않아 minocycline의 잔존물이 지속적으로 존재했기 때문으로 생각되며 minocycline이 소량 잔존하고 있는 경우 TGF- $\beta$ 1의 작용에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. Somerman등<sup>15)</sup>은 고농도의 minocycline에 24시간 이상 세포를 노출시킬 경우 최소의 세포부착을 야기하며 결국 세포활성이 상실된다고 하였고, 고농도의 minocycline을 짧은 기간 투여했을 때는 가역적인 저해가 일어난다고 하였으며 원래의 활성을 되찾는데는 7일정도가 소요된다고 하였다. 본실험의 <sup>3</sup>H-thymidine assay에서 minocycline의 처리여부에 관계없이 1 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1 농도에서 최대의 DNA 합성능을 보였고, 이는 Oates등<sup>30)</sup>의 연구결과와 일치하였다. Oates등은 1ng/ml 농도의 TGF- $\beta$ 1으로 8~24시간 동안 배양한 경우 유의하게 증진된 mitogenic response를 보였다고 하였다.

치주조직은 세포의 구성, 단백질의 양과 형태, 석회화정도, 대사활성도가 다른 4개의 조직 즉 치은, 치주인대, 백악질, 치조골로 구성되어 있으며 각 조직의 세포외기질은 교원질, 비교원성 단백질, glycosaminoglycans등으로 구성되어 있다. 건강한 치은의 교원질은 총단백질의 약 60%를 차지하며 type I이 가장 중요한 교원질이고 그 외 type III, V가 치은의 결합조직에서 발견되고 type IV, VI는 기저막 부위에 존재한다<sup>61)</sup>. 치주인대내의 교원질은 총단백질의 47-52%를 차지하며 type I, III, IV, V, VI, XII등이 존재한다<sup>61), 62), 63)</sup>. 이중 type I 교원질이 전체 교원질의 80%를 차지하므로 주된 교원질로 생각된다<sup>64)</sup>. 백악질은 교원질, 당단백질, 단백질당을 포함한 유기물질을 약 50% 정도 함유하고 있으며 이 중 주성분은 교원질로써 type I 90%, type III가 5%정도 유기질내 존재하고 있다<sup>62)</sup>. 치조골은 40% 유기물질과 60% 무기물질로 구성되어 있으며 유기물질의 75%를 차지하는 교원질은 거의 조골세포에서 생성되며 대부분 type I과 소량

의 type III와 V이 존재한다<sup>65)</sup>. 이와같이 각 치주조직의 세포외기질은 교원질이 주성분을 이루고 있으므로 치주질환에 이환된 치유부의 재생을 위해서는 교원질의 합성이 중요하다고 할 수 있다. 한편 교원질에는 다른 단백질에서는 발견되지 않는 hydroxyproline 잔기가 존재하는데 이는 교원질에 존재하는 glycine 잔기의 amino side에 있는 proline 잔기가 수산화됨으로써 hydroxyproline 잔기로 전환된다. 그러므로 proline 잔기의 hydroxyproline 잔기로의 전환을 측정함으로써 교원질 합성을 측정할 수 있다<sup>66)</sup>.

TGF- $\beta$ 1은 교원질, fibronectin, osteonectin 등<sup>37)</sup>,<sup>67)</sup>과 같은 세포외기질의 성분들의 생산을 촉진하며<sup>25)</sup>,<sup>68)</sup> 또한 lysosomal enzyme의 생산과 분비를 억제하여 새롭게 형성된 세포외기질의 분해를 억제<sup>69, 70)</sup>하는 두 가지 기전에 의해 세포외기질의 생산을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서는 2일군에서 모든 실험군이 대조군에 비해 매우 증가된 총단백질량을 보였고 교원질 합성은 1일군에 비해 2일군에서 증가하였으나 대조군에 비해서는 감소하였다.

이러한 사실은 minocycline과 TGF- $\beta$ 1을 연속적으로 투여하는 경우 총단백질의 생산은 증가시키지만 교원질성 단백질의 생산보다는 비교원질성 단백질의 생산을 더 촉진한다는 사실을 말한다. Somerman 등은 minocycline이 단백질 및 교원질 생산에는 영향을 미치지 않는다고 하였다. 따라서 본 실험결과는 TGF- $\beta$ 1에 의한 결과라고 생각되나 minocycline이 어떤 보조적 역할을 할 수 있다는 것을 배제시킬 수는 없다. 특히 고농도의 minocycline을 투여한 2일군에서 총단백질 및 교원질 합성능이 다른 군에 비해 낮게 나타나는 것으로 보아 두 약제를 병행투여하는 경우 minocycline이 세포에 영향을 미쳐 TGF- $\beta$ 1의 총단백질 및 교원질 합성을 약간 저해하는 것으로 생각된다.

## V. 결론

치주인대세포에 20 및 100 $\mu$ g/ml minocycline을 처리하고 1.5시간 동안 배양후 1 및 10 ng/ml의 TGF- $\beta$ 1을 처리하여 1, 2일동안 배양한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 100 $\mu$ g/ml minocycline을 투여하고 1.5시간 동안 배양한 결과 치주인대세포의 부착이 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, 세포의 형태도 대조군에 비해 세포돌기의 모습이 명확하게 관찰되었다.
2. MTT assay와 <sup>3</sup>H-thymidine assay 결과 치주인대세포의 세포증식은 minocycline과 TGF- $\beta$ 1을 연속 투여시 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나 TGF- $\beta$ 1 단독 투여군에 비해서는 뚜렷하게 증가된 결과를 보이지 못했다.
3. <sup>3</sup>H-thymidine assay 결과 1일군에서는 minocycline 단독 처리군에서 약간 감소되는 경향이 있었으나 대조군과 비교하여 유의한 차이는 나타나지 않았다. 반면에 2일군에서는 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다.
4. 총단백질 합성은 minocycline과 TGF- $\beta$ 1을 연속투여시 대조군에 비해 유의하게 증가되었으나, 교원질의 합성능은 대조군에 비해 감소되었다.

이상의 결과를 종합할 때 minocycline과 TGF- $\beta$ 1의 연속 투여가 치주인대세포의 세포 활성을 TGF- $\beta$ 1 단독 투여시보다 유의하게 증가시키지는 못함을 알 수 있었다. 이는 minocycline이 치주인대세포의 초기부착에는 유의한 효과가 있지만 지속적으로 세포에 영향을 미칠 경우 세포증식에 장애를 가져올 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleric U, and Mangan DF. : Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol* 64 : 450-455, 1993.
2. Aleo JJ, Derezis FA, and Faber PA. : In vitro attachment of human gingival fibroblast to root surface. *J Periodontol* 46 : 639-645, 1975.
3. Aleo JJ, Derezis FAk, Faber PA, and Varboncoeur AP. : The presense and biologic activity of cementum bound endotoxin. *J Periodontol* 45 : 672-675, 1974.
4. Caton JG, and Zander HA. : The attachment between tooth and gingival tissues after periodic root planing and soft tissue curettage. *J Periodontol* 50 : 462-466, 1979.
5. Polson AM. : The root surface and regeneration : present therapeutic limitations and future biologic potentials. *J Clin Periodontol* 13 : 995-999, 1986.
6. Narayanan AS, Nakae H, and Miki Y. : Biology of the gingiva : The connective tissue in health and disease and molecular aspects of periodontal regeneration and reattachment. *Recent Advances in Clinical Periodontology*. Elsevier Science Publishers. pp 51-61, 1988.
7. Garrett S, Crigger M, and Egelberg J. : Effects of citric acid on diseased root surface. *J Periodontol* 13 : 155-163, 1978.
8. Register AA, and Burdick F. : Accelerated reattachment and cementogenesis to dentin, demineralized in situ. II. Defect repair. *J Periodontol* 47 : 497-505, 1976.
9. Terranova VP, and Martin GR : Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth surface. *J Periodont Res* 17 : 530-533, 1982.
10. Caffesse RG, Holden MJ, and Kon S. : The effects of citric acid and fibronectin application on healing following surgical treatment of naturally occuring periodontal disease in beagle dogs. *J Clin Periodontol* 12 : 578-590, 1985.
11. Ryan PC, Waring C, and Seymour GJ. : Periodontal healing with citric acid fibronectin treatment in cats. *J Dent Res*. 65 : 483-483, 1986.
12. Terranova VP, Franzetti LC, and Hick S. : A biochemical approach to periodontal regeneration : Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodont Res* 21 : 330-337, 1986.
13. Ciancio S, Mather M, McMullen J. : An evaluation of minocycline in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 51 : 530-534, 1980.
14. Gomes BC, Golub LM, Ramamurthy NS. : Tetracyclines inhibit parathyroid hormone - induced bone resorption in organ culture. *Experienta* 40 : 1273-1275, 1984.
15. Somerman MJ, Foster RA, Vorsteg G, Progebin K, and Wynn RL. : Effects of minocycline of fibroblast attachment and spreading. *J Periodont Res* 23 : 154-159, 1988.
16. 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 Periodontol* 15 : 297-303, 1983.
17. Genco RJ. : Antibiotics in the treatment of human periodontal disease. *J Periodontol*

- 52 : 545-558, 1981.
18. 정 순규, 남궁 혁, 신 형식 : PDGF 와 TGF- $\beta$ 이 배양 인체 치은 섬유모세포와 치주인대 세포의 활성화에 미치는 영향. 대한 치주과 학회지 25 : 133-144, 1995.
  19. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, and Sporn MB. : TGF- $\beta$  in human platelets. *J Biol Chem* 258 : 7155-7160, 1983.
  20. Frolick CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, and Sporn MB. : Purification and initial characterization of TGF- $\beta$  from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 3676-3680, 1983.
  21. Roberts AB, Anzano MA, and Meyers CA, et al. : Purification and properties of a type TGF- $\beta$  from bovine kidney. *Biochem* 22 : 5692-5698, 1983.
  22. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern AF, and Sporn MB. : Type beta transforming growth factor : a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 119-123, 1985.
  23. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, and de Crombrughe B. : Some recent advances in the chemistry and biology of TGF- $\beta$ . *J Cell Biol* 105 : 1039-1045, 1987.
  24. Keski-Oja J, Leof EB, Lyons RM, Coffey RJ, and Jr, Moses HL. : Transforming growth factor and control of neoplastic cell growth. *J Cell Biochem* 33 : 95-107, 1987.
  25. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, and Kang AH. : Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by TGF- $\beta$ . *J Exp Med* 165 : 251-256, 1987.
  26. Ignortz R, and Massgugue I. : TGF- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol Chem* 261 : 4337-4345, 1986.
  27. Antosz ME, Bellows CG, and Aubin JE. : Effects of TGF- $\beta$  and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 140 : 386-393, 1989.
  28. Centrella M, McCarthy TL, and Canalis E. : TGF- $\beta$  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.
  29. Centrella M, Massague J, and Canalis E. : Human platelet-derived TGF- $\beta$  stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 119 : 2306-2312, 1986.
  30. Oates TW, Rouse CA, and Cochran DL. : Mitogenic effect of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 65 : 142-148, 1993.
  31. Piche JE, and Graves DT. : Study of the growth factor requirements of human bone-derived cell. A Comparison with human fibroblasts. *Bone* 10 : 131-138, 1989.
  32. Kells AF, Schwartz HS, Bascom CC, and Hoover RL. : Identification and analysis of transforming growth factor beta receptors on primary osteoblast-enriched cultures derived from adult human bone. *Connective Tissue Res* 27 : 197-209, 1992.
  33. Hughes FJ, Aubin JE, and Heersche JN. : Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone*

- Miner 19 : 63-74, 1992.
34. Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Grownwald RG, Minne HW, and Ziegler R. : Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors. *Endocrinology* 127 : 69-75, 1990.
  35. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, and Genco RJ. : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 63 : 515-525, 1992.
  36. Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, and Deuel TF. : Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor beta. *Science* 237 : 1333-1336, 1987.
  37. Roberts AB, Sporn MB, and Assoian PK, et al. : Transforming growth factor type- $\beta$  : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Nat Acad Sci(USA)* 83 : 4167-4171, 1986.
  38. Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JM, and Sodek J. : Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* 219 : 1329-1331. 1983.
  39. Lynch SE, Colvin RB, and Antoniades HN. : Growth factors in wound healing : single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 84 : 640-646, 1989.
  40. Peterkofsky B, and Diegelmann 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.
  41. Bowers GM, Schallhorn RG, and Melonig JT. : Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. *J Periodontol* 53 : 509-514, 1982.
  42. Bokyo GA, Melcher AH, and 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.
  43. Stahl SS. : Repair or regeneration following periodontal therapy? *J Clin Periodontol* 6 : 389-396, 1979.
  44. Melcher AH. : On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 47 : 256-260, 1976.
  45. Melcher AH. : Repair of wounds in the periodontium of the rat. influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol* 15 : 1183-1204, 1970.
  46. Isidor F, Karring T, and Nyman S, et al. : The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. *J Clin Periodontol* 13 : 145-150, 1986.
  47. Cho MI, and Garant PR. : Sequential events in the formation of collagen secretion granules with special reference to the development of segment-long-spacing like aggregates. *Anat Res* 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 Res* 199 : 459-471, 1981.
  49. Sodex J, and 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, and Hasegawa K. : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodont Res* 25 : 179-185, 1990.
51. Topham RT, Chieco DJ, Jr, Cattone VH, Hiuton DA, and 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, and Noguchi T. : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch Oral Biol* 32 : 673-678, 1987.
53. Gottlow J, Nyman S, Karring T, and Lindhe J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 11 : 494-503, 1984.
54. Wikesjo ME, Baker PJ, Christersson LA, Genco PJ, Raymond SH, Diflorio RM, and Terranova VP. : A biochemical approach to periodontal regeneration. Tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodont Res* 21 : 322-329, 1986.
55. Crabb ID, O'Keefe RJ, Puzas JE, and Rosier RN. : Synergistic effect of transforming growth factor- $\beta$  and fibroblast growth factor on DNA synthesis in chick growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 5 : 1105-1112, 1990.
56. Graves DT, and Cochran DL. : Biologically active mediators : Platelet-derived growth factor, monocyte chemoattractant protein-1, and transforming growth factor- $\beta$ . *Curr Opin Dent* 1 : 809-815, 1991.
57. Royce LS, and Baum BJ. : Physiologic levels of salivary epidermal growth factor stimulate migration of an oral epithelial cell line. *Biochem Biophys Acta* 1092 : 401-403, 1991.
58. 강 승훈, 서 조영, 박 준봉. : 미노사이클린 이 치주인대 세포의 부착과 전개에 미치는 효과. *대한 구강 생물학회지* 15 : 1 : 29-37, 1991.
59. Klebe RJ. : Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature* 250 : 248-251, 1974.
60. Narayanan AS, and Page RC. : Connective tissue of the periodontium : A summary of current work. *Collagen Rel Res* 3 : 33-64, 1983.
61. Dublet B, Dixon E, de Miguel E, and van der Rest M. : Bovine type XII collagen : amino acid sequence of a 10kDa pepsin fragment from periodontal ligament reveals a high degree homology with the chicken alpha one sequence. *FEBS Lett* 233 : 177-180, 1988.
62. Becker J, Schuppan D, Rabanus JP, Rauch RN, Echoy U, and Gelderblom HR. : Immunoelectronmicroscopic localization of collagen type I, V, VI and procollagen type III in human periodontal ligament and cementum. *J Histochem Cytochem* 39 : 103-110, 1991.
63. Romanos GE, Schroter-Kermani C, Hinz N, Wachtel HC, and Bernimoulin JP. : Immunohistochemical localization of collagenous components in healthy periodontal tissue of the rat and marmoset (*Callithrix jacchus*) II. Distribution of collagen types IV, V and V. *J Periodont Res* 26 : 323-332, 1991.
64. Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, and Chung E. : Proteins of the periodontium, Identification of collagen with the [alpha 1(I)]<sub>2</sub> and [ |

- alpha 1 [III]3 structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem* 250 : 8907-8912, 1975.
65. Hauschka PV, and Wians FH. : Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat Rec* 224 : 180-188, 1989
66. Bornstein P. : Structurally distinct collagen types. *Ann Rev Biochem* 49 : 957-1003, 1980.
67. Wrana JL, Maeno M, Hawrylyshyn B, Yao K, Domenicucci C, and Sodek J. : Differential effects of transforming growth factor- $\beta$  on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol* 106 : 915-924, 1988.
68. Ignatz RA, Endo T, and Massague J. : Regulation of fibronectin and type-I collagen m-RNA levels by transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 262 : 6443-6446, 1987.
69. Chiang CP, and Nilsen-Hamilton M. : Opposite and selective effects of epidermal growth factor and human transforming growth factor- $\beta$  on the production of secreted proteins by murine 3T3 cells and human fibroblasts. *J Biol Chem* 261 : 10478-10481, 1986.
70. Overall CM, Wrana JL, and Sodek J. : Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 264 : 1860-1869, 1989.

## 사진 부도 설명(explanation of photography)

- photo. 1 : minocycline untreated group, 1.5 hours, x40
- photo. 2 : minocycline 100 $\mu$ g/ml treated group, 1.5 hours, x40
- photo. 3 : minocycline untreated group, 1.5 hours, x100
- photo. 4 : minocycline 100 $\mu$ g/ml treated group, 1.5 hours, x100
- photo. 5 : minocycline untreated group, 6 hours, x40
- photo. 6 : minocycline 100 $\mu$ g/ml treated group, 6 hours, x40
- photo. 7 : minocycline untreated group, 6 hours, x100
- photo. 8 : minocycline 100 $\mu$ g/ml treated group, 6 hours, x100

Photo. 1

Photo. 2

Photo. 3

Photo. 4

Photo. 5

Photo. 6

Photo. 7

Photo. 8

## Effects of TGF- $\beta$ 1 on Cellular Activity of Minocycline-Pretreated Human Periodontal Ligament Cells

Seung-Oh Yang, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

The initial events required for periodontal regeneration is the attachment, spreading, and proliferation of appropriated cells at the healing sites. These have been reported that minocycline stimulates the attachment of periodontal ligament cells, and also TGF- $\beta$ 1 enhances the proliferation of periodontal ligament cells. The purpose of the present study was to evaluate the effects of TGF- $\beta$ 1 on the cellular activity of minocycline-treated human periodontal ligament cells.

Periodontal ligament cells were obtained from the explants of healthy periodontal ligaments of extracted 3rd molars or premolar teeth extracted from the patients for orthodontic treatment. The cells were cultured in minimal essential medium( $\alpha$ -MEM) supplemented with 10,000units/ml penicillin, 10,000 $\mu$ g/ml streptomycin and 10% FBS(fetal bovine serum) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide and the 5th to the 8th passages of the cells were used.

To evaluate the effect of minocycline on cell attachment, the cells were seeded at a cell density of  $1.5 \times 10^4$  cells/well in 24-well culture plates and treated with 20 $\mu$ g/ml and 100 $\mu$ g/ml of minocycline for 1.5 h. After trypsinization, the cells were counted with hemocytometer and were taken photographs for observation of cellular morphology.

To evaluate the effect of TGF- $\beta$ 1 on minocycline-pretreated periodontal ligament cells, the cells were seeded at a cell density of  $1 \times 10^4$  cells/ well in 24-well culture plates and treated with 20 $\mu$ g/ml and 100  $\mu$ g/ml of minocycline for 1.5 h. After incubation, 1 and 10ng/ml of rh-TGF- $\beta$ 1 were also added to the each well and incubated for 1 and 2 days, respectively. Then, MTT assay, DNA synthesis( $^3$ H-thymidine assay), and protein and collagen assay(3H-proline assay) were carried out.

In the MTT assay, after 200ul MTT solution(concentration of 5mg/ml) were added to the each well of the 24-well plates and incubated for 3 hours, and 200 ul DMSO were added so as to dissolve insoluble blue formazan crystals which was formed in incubated period. Then it read plates on a ELISA reader.

For mitogenic assay, 1 uCi/ml  $^3$ H-thymidine was added to each well for the final 2 hours of the incubation periods. After labeling, the wells were washed 3 times with ice cold PBS and 4 times with 5% TCA to remove unincorporated label and precipitate the cellular DNA. DNA, with the incorporated  $^3$ H-thymidine, was solubilized with 500 ul of 0.1% NaOH/0.1% SDS. A 250 ul aliquot was removed from each well and placed in a scintillation vial with 4ml of scintillation cocktail. Using an liquid scintillation counter, counts per minute(CPM) were determined for each samples.

3 uCi/ml  $^3\text{H}$ -proline was added to each well for the final 4 hours of the incubation periods and total protein and percent collagen synthesis were carried out.

The results indicate that minocycline treated group with  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration for 15 hours significantly increased than that of control in cell attachment, and cell process is also evident compared with that of control in cell morphology, and the cellular activity and DNA synthesis rate of cells treated minocycline and TGF- $\beta$ 1 significantly increased than that of control values, but were below to values of the TGF- $\beta$ 1 only treated group in MTT assay and  $^3\text{H}$ -thymidine assay, and the total protein synthesis of minocycline and TGF- $\beta$ 1 treated group also significantly increased than that of control values, but the percent collagen synthesis of tested group significantly decreased to compared with control.

On the above the findings, the tested group of minocycline and TGF- $\beta$ 1 did not increase the effect on the cell activity than TGF- $\beta$ 1 only tested group and the tested group of minocycline inhibited cell activity. This results indicate that minocycline was effective on cell attachment in early stage, but it is harmful to cell activity, that inhibitory effect of minocycline was compensated with stimulatory effect of TGF- $\beta$ 1.