

치주인대세포 및 치은섬유아세포의 증식능에 대한 Epidermal growth factor의 영향

김선우 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주치후의 치유과정을 치주조직 중 치은상피세포, 치은결체조직세포, 치조골세포, 치주인대세포의 증식 등으로 분리하여 보았을 때 다음과 같은 양상으로 나타난다¹⁻³⁾. 즉, 다른 조직세포의 증식보다 상피세포의 증식이 빠른 경우 대부분의 치유양상은 근단 방향으로 상피세포의 빠른 증식과 이주에 의하여 긴 접합상피 부착의 결과를 갖게 되고⁴⁻⁶⁾, 치은결체조직세포의 증식이 빨리 일어나는 경우의 치유양상은 치은결체조직섬유의 배열이 치아의 장축에 평행하게 될 뿐만 아니라 치근흡수를 초래하게 되며⁷⁻⁸⁾, 치조골세포의 증식이 빠른 경우는 치아와 치조골간의 골성간격이 일어나게 된다^{7, 9, 10)}. 그러므로 가장 이상적인 치유의 형태는 더 이상의 부착 상실을 예방하는 것과 더불어 치주조직의 치은상피세포, 결체조직세포의 증식이 치조골 및 백악질의 형성과 서로 조화를 이루게 되어 치주조직 파괴 전의 양상으로 치주조직의 재생을 이루는 것이라 하겠다. Nyman 등^{11, 12)}은 치은상피의 치은결체조직을 배제시킨 실험모델에서 치유되는 양상을 살펴본 결과 치주질환에 이환된 치근면에 교원질 섬유가 삽입된

신생백악질이 형성됨을 관찰하므로써 치주조직의 재생에 치주인대세포가 중요한 역할을 할 것이라고 시사하였다.

치주인대는 결체조직세포, 상피세포, 방어기전에 작용하는 세포와 신경혈관계에 관여하는 세포들로 구성되어 있으며 충격흡수기능, 교합압의 치조골 전달기능, 형성기능, 영양과 감각기능 등을 담당하고 있다. 그 중 결체조직내에 있는 세포로는 섬유아세포, 조골세포, 백악아세포, 파골세포, 미분화된 중배엽세포들이 존재하며 섬유아세포가 치주인대 전 부피의 약 50%를 차지한다고 알려져 있으며^{13, 14)} 미분화된 중배엽세포들은 혈관주위에 분포하고 있으면서 어떠한 조건이 주어지면 치주인대에 존재하고 있는 모든 결체조직세포로 분화할 수 있는 복합기능을 가진 세포로 알려져 있다. 그러므로 치주조직의 재생이 일어나도록 하기 위해서는 치주인대내에 있는 미분화된 전구세포들이 노출된 치근면에 이주, 부착, 증식하여 재생된 치주인대와 함께 성숙되어야 한다.

Terranova와 Wikesjö¹⁵⁾ 등은 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자(Polypeptide Growth Factor)에 의해 조절되

며 폴리펩타이드계 성장인자가 치주조직 재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라고 시사하였다. 수많은 종류의 폴리펩타이드계 성장인자중 창상치유에 관여하는 성장인자로서 혈소판유래성장인자(Platelet-Derived Growth Factor), 섬유아세포성장인자(Fibroblast Growth Factor), 변형성장인자(Transforming Growth Factor), 인슐린유사성장인자(Insulin-like Growth Factor), 상피성장인자(Epidermal Growth Factor), 인터루킨-1(Interleukin-1) 등이 있으며¹⁶⁾ 이중 상피성장인자는 내배엽, 중배엽, 외배엽의 다양한 세포들에 대한 성장과 분화를 촉진시키며 단백질합성의 증가, 상처치유의 가속화, 맥관형성등의 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁻²⁰⁾.

상피성장인자의 구조는 6045 Da의 분자량을 가지고 53개의 아미노산 가닥이 서로 결합되어 있는 단일쇄 단백질로 되어 있다. 유리되는 근원은 쥐의 악하선에서 처음으로 발견되었고 그 외에 Brunner's gland, 혈액, 중추신경계, 양수등에서도 존재하는 것으로 알려져 있으며 사람의 뇨에서도 분비되는데 이것은 특별히 urogastrone이라고도 한다²¹⁻²³⁾.

생체실험에서의 상피성장인자에 관한 연구에 대해 살펴보면 Buckley 등²⁴⁾은 육아조직에 적용시 조직의 기질화가 더 잘 일어나고 혈관의 내성장과 세포소기관들의 증가와 교원질, RNA, glycosaminoglycan합성이 증가 한다고 보고하였다.

Laato 등²⁵⁾은 쥐의 육아종에서 상피성장인자의 효과에 대한 실험에서 상피성장인자 농도의 증가에 따라 육아종섬유아세포의 분열이 촉진됨으로서 상처치유에 효과적임을 입증하였다. Tsutsumi²⁶⁾와 Culbertson 등²⁷⁾은 상피성장인자가 각막상피의 성장을 촉진시킨다고 보고하였다. Olsen 등²⁸⁾은 상피성장인자가 아세트산에 의해 야기되는 위염의 치유를 촉진함으로써 위십이지장 점막의 보호작용을 한다고 보고하였고, Itoh 등²⁹⁾도 이와 같은 효

과를 관찰하고 somatostatin, prostaglandin E₂의 증가에 의해 간접적으로도 영향을 받을 수 있다고 보고하였다.

시험관적 실험에서의 상피성장인자에 관한 연구를 살펴보면, Turkington 등³⁰⁾은 상피성장인자는 유선세포의 DNA합성을 증가시킴으로서 세포증식을 조절할 수 있다고 보고하였다. Tashjian 등³¹⁾은 상피성장인자가 생쥐의 두개골과 쥐의 장골세포에서 골 흡수를 촉진시킨다고 하였으며, Canalis와 Raisz 등³²⁾은 배양된 태서두개관세포에서 상피성장인자가 DNA합성은 증가시키지만 교원질합성은 감소시킨다고 보고하였다. Hiramatsu 등³³⁾은 쥐의 두개골에서 배양한 조골세포에서 상피성장인자가 세포수와 단백질합성을 증가시킨다고 하였으며 Canalis 등³⁴⁾은 상피성장인자가 쥐에서 교원질합성과 알칼린인산효소의 활성도를 억제한다고 보고하였다. Hata 등³⁵⁾은 MC3T3-E1세포에 상피성장인자의 투여시 DNA합성의 증가와 교원질합성이 감소한다고 하였고, Theselff와 Patanen 등³⁶⁾은 치아의 치근단조직으로부터 상피성장인자의 수용체에 관한 연구결과 상피성장인자가 치아맹출 증가에 영향을 줄 수 있다고 보고하였고 이러한 결과는 치주인대세포, 백악아세포, 파골세포를 함유한 치배엽세포에 대한 상피성장인자의 유사분열 효과에 의한 것이라고 하였다.

치주조직에 대한 실험에서는 Huey 등³⁷⁾은 상피성장인자가 사람의 치은섬유아세포에서 DNA합성과 단백질합성의 증가를 일으킨다고 보고하였고, Matsuda³⁸⁾ 등은 발치와에서 채득한 치주인대세포에 대한 연구에서 상피성장인자는 약간의 유사분열효과와 화학주성반응을 나타내고 총단백질 양에는 변화를 일으키지 않았으며 교원질합성의 감소를 일으킨다고 하였으며 치주인대 섬유아세포는 많은 상피성장인자 수용체를 함유하고 있고 무기질조직 형성세포로 분화가 일어나면서 그 수가 감소한다고 보고하였다. 최 등³⁹⁾은 사람의 치

은섬유아세포에서 상피성장인자가 0.2%의 FBS 하에서는 DNA 합성을 증가시키지만 높은 농도의 10%의 FBS하에서는 변화를 일으키지 않으며 교원질합성은 감소시킨다고 보고하였다.

이상의 연구를 살펴본 결과 지금까지 치주조직 치유에 관여하는 세포들에 미치는 영향은 잘 규명되어 있지 않아 다양한 세포들의 성장과 분화에 영향을 끼치는 것으로 알려진 상피성장인자를 선택하여 초기배양된 치주인대세포와 치은섬유아세포에 농도별, 시간별로 주입하여 두 세포군의 세포증식능에 미치는 영향과 각 조건에 따른 두 세포군간의 세포증식능을 상호 비교해 보고자 본 실험을 실시하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 재료(시약)

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 DMEM으로 표기)을 사용하였고, fetal bovine serum(Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그 외 phosphate buffered saline(이하 PBS로 표기), trypsin, ethylenediamine-tetraacetic acid(이하 EDTA로 표기) bovine serum albumin과 5-Bromo-2'-deoxy-uridine, nuclease, incubation buffer, Anti-BrdU-POD, Fab fragment, washing buffer, substrate enhancer, peroxidase substrate가 포함된 5-Bromo-2'-deoxy-uridine labeling and detection kit III (Boehringer Mannheim사, 독일), 유전자 재조합형 상피성장인자(Genzyme사, 미국)를 사용하였다.

2. 치주인대세포 및 치은섬유아세포의 세포배양

교정치료를 목적으로 경북대학교병원에 내

원한 환자의 발거될 제일소구치를 해당부위로 하고 초기배양과정에서 야기될 수 있는 세균감염을 예방하고자 통상의 배양액에 포함되는 항생제 용량의 2배인 200U/ml 페니실린(근화제약, 한국)과 200/ml 스트렙토마이신(동아제약, 한국)이 첨가된 DMEM을 생검배지로 준비하였다.

조직처리과정에서 치은조직합입을 배제하고 치주인대조직만 채취하기 위하여 제일소구치 부위에 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 세절한 다음 35mm 배양접시에 고르게 분포시키고 치은섬유아세포의 배양을 위하여 절제된 정상치은을 세절하여 역시 35mm 배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% FBS와 100U/ml 페니실린, 100g/ml 스트렙토마이신이 포함된 DMEM을 넣고 37°C, 100%습도, 5% CO₂ 공기혼합배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 치주인대세포와 치은섬유아세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층밀생이 형성된 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였으며 이 실험에서는 4세대에서 6세대 사이의 세포를 사용하였다.

3. 치주인대세포 및 치은섬유아세포의 증식능 측정

치주인대세포 및 치은섬유아세포를 각각 5×10^3 cells/200ml가 되게 96 well culture plate에 넣고 5일간 배양하여 육안적인 밀생상태가 되게 하였다. 그 후 세포배양액을 제거한 세포층을 PBS로 2회 세척하고 1% FBS가 든 DMEM으로 교체하여 하루동안 세포 주기를 정지시킨 후 여기에 1, 10, 50, 100, 200g/ml 농도의 상피성장인자를 첨가한 균을 실험군

으로 하고, 상피성장인자를 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였다. 각 시간별 배양 6시간 전에 10 M/l 농도의 5-Bromo-2'-deoxy-uridine을 well당 10 μ l 첨가하여 5-Bromo-2'-deoxy-uridine이 DNA내로 편재되는 양으로써 두 세포군의 증식능을 측정하였다.

5-Bromo-2'-deoxy-uridine이 DNA내로 편재되는 양을 측정하기 위해서 96 well culture plates내의 세포배양액을 제거하고, well당 10% FBS가 함유된 배양액으로 주의 깊게 2회 세척한 후 -20°C에서 30분 동안 well당 200 l의 찬 고정액으로 세포를 고정하였다. 고정액을 주의 깊게 제거하고, 250 ml 배양액으로 3회 세척한 다음 well당 100 ml의 Nuclease working solution을 첨가한 다음 37°C에서 30분간 CO₂가 없는 상태에서 배양한 후 배양액으로 3회 세척하고 well당 100 ml의 Anti-BrdU-POD, Fab fragment를 첨가하고 37°C에서 30분간 배양하였다.

Anti-BrdU-POD, Fab fragment를 제거하고 250 ml의 washing buffer로 3회 세척하고 substrate enhancer가 첨가된 100 ml의 peroxidase substrate를 첨가하여 녹색이 보일

때까지 실온에 둔 후 reference wavelength를 490nm로 하고 test wavelength를 405nm로 하여 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader로 측정하였다.

III. 결 과

1. 치은섬유아세포의 증식능에 미치는 상피성장인자의 영향

상피성장인자의 적용에 따른 치은섬유아세포의 증식능은 24시간 동안 배양시 대조군의 0.253 \pm 0.051 Absorbance(A_{405nm}/A_{490nm})에 비하여 1 η g/ml에서는 0.252 \pm 0.070 Absorbance, 10 η g/ml에서는 0.338 \pm 0.082 Absorbance, 50 η g/ml에서는 0.416 \pm 0.054 Absorbance, 100 η g/ml에서는 0.437 \pm 0.071 Absorbance, 200 η g/ml에서는 0.530 \pm 0.044 Absorbance로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 50, 100, 200 η g/ml의 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.01)를 보였다 (Table 1, Fig 1 참조).

치은섬유아세포에 상피성장인자를 주입 후 48시간 동안 배양한 군에서는 대조군의 0.212

Table 1. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts cultured for 24, 48 and 72 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants

Conc. (ng/ml)	DNA synthetic activity (Absorbance A _{405nm} /A _{490nm})		
	24 hours (mean \pm S.D.)	48 hours (mean \pm S.D.)	72 hours (mean \pm S.D.)
0	0.253 \pm 0.051	0.212 \pm 0.030	0.162 \pm 0.042
1	0.252 \pm 0.070	0.259 \pm 0.029	0.181 \pm 0.031
10	0.338 \pm 0.082	0.353 \pm 0.016**	0.155 \pm 0.082
50	0.416 \pm 0.054**	0.496 \pm 0.045**	0.198 \pm 0.100**
100	0.437 \pm 0.071**	0.523 \pm 0.084**	0.174 \pm 0.119
200	0.530 \pm 0.044**	0.617 \pm 0.075**	0.266 \pm 0.123**

**significantly different from control value (P<0.01)

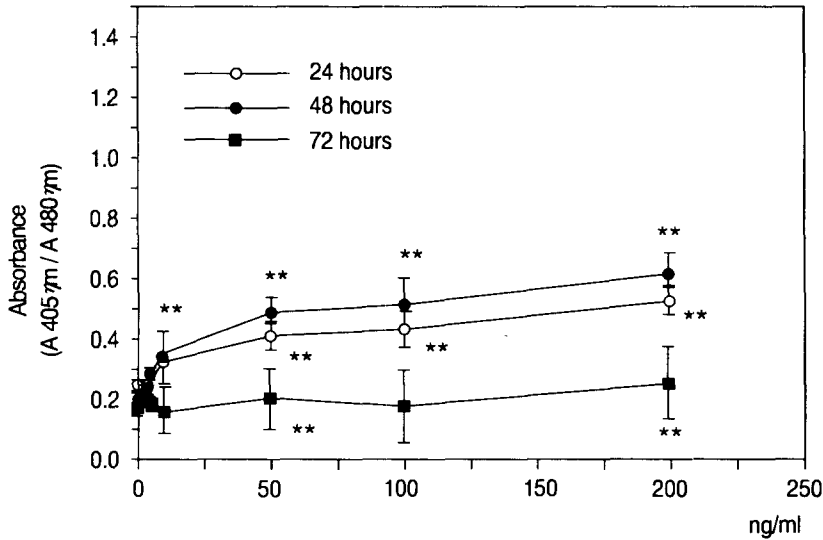


Fig 1. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts cultured for 24, 48, and 72 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants.

** significantly different from control value(P<0.01)

±0.030 Absorbance에 비하여 17ng/ml에서는 0.259±0.029 Absorbance, 107ng/ml에서는 0.353±0.016 Absorbance, 507ng/ml에서는 0.456±0.045 Absorbance, 1007ng/ml에서는 0.523±0.084 Absorbance, 2007ng/ml에서는 0.617±0.075로 24시간 처리와 유사한 양상으로 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 17g/ml를 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.01)를 보였다 (Table 1, Fig. 1 참조).

치은섬유아세포에 상피성장인자를 주입 후 72시간 동안 배양한 군에서는 대조군의 0.162±0.042 Absorbance에 비하여 1g/ml에서는 0.181±0.031 Absorbance, 107ng/ml에서는 0.185±0.082 Absorbance, 507ng/ml에서는 0.198±0.100 Absorbance, 1007ng/ml에서는 0.174±0.119 Absorbance, 2007ng/ml에서는 0.266±0.123 Absorbance로 24, 48시간 처리시 보다는 증식능이 떨어졌으나 전반적으로는 농도의존적으로 미약하게 증가하는 경향을 보였으며,

50, 2007ng/ml의 실험군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이(P<0.01, P<0.05)를 나타내었다(Table 1, Fig 1 참조).

2. 치주인대세포의 증식능에 미치는 상피성장인자의 영향

상피성장인자의 적용에 따른 치주인대세포의 증식능은 24시간 동안 배양시 대조군의 0.145±0.014 Absorbance에 비하여 17ng/ml에서는 0.160±0.011 Absorbance, 107ng/ml에서는 0.220±0.018 Absorbance, 507ng/ml에서는 0.218±0.013 Absorbance, 1007ng/ml에서는 0.219±0.018 Absorbance, 2007ng/ml에서는 0.216±0.013 Absorbance로 농도의존적으로 증가하였으나 507ng/ml부터는 증가량이 정체되는 경향을 보였으며, 17ng/ml를 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이(P<0.01)를 나타내었다(Table 2, Fig 2 참조).

치주인대세포에 상피성장인자를 주입 후 48

Table 2 Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human periodontal ligament cells cultured for 24, 48 and 72 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants

Conc.(ng/ml)	DNA synthetic activity(Absorbance A_{405nm}/A_{490nm})		
	24 hours (mean \pm S.D.)	48 hours (mean \pm S.D.)	72 hours (mean \pm S.D.)
0	0.145 \pm 0.014	0.261 \pm 0.073	0.154 \pm 0.005
1	0.160 \pm 0.011	0.324 \pm 0.080	0.150 \pm 0.007
10	0.220 \pm 0.018**	0.409 \pm 0.114*	0.248 \pm 0.024**
50	0.218 \pm 0.013**	0.527 \pm 0.152**	0.213 \pm 0.011**
100	0.219 \pm 0.018**	0.582 \pm 0.183**	0.281 \pm 0.025**
200	0.216 \pm 0.013**	0.704 \pm 0.238**	0.277 \pm 0.033**

*significantly different from control value (P<0.05)

**significantly different from control value (P<0.01)

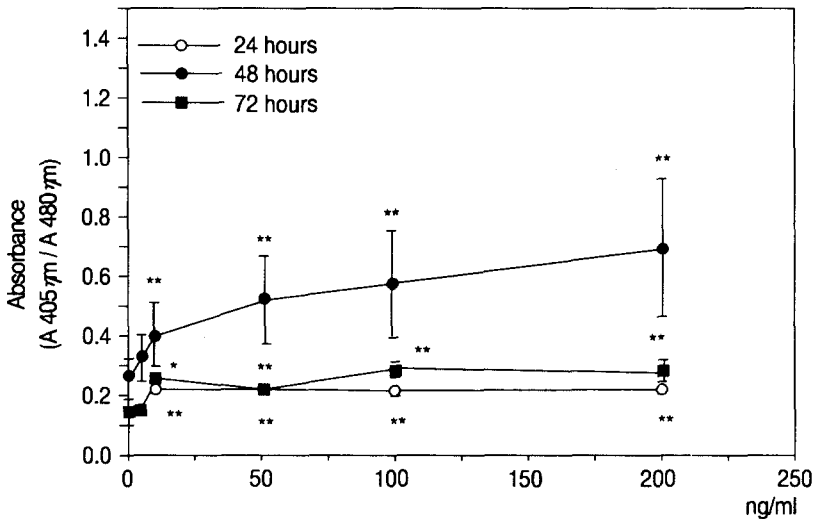


Fig 2. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human periodontal ligament cells cultured for 24, 48, and 72 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants.

*significantly different from control value (P<0.05)

**significantly different from control value (P<0.01)

시간 동안 배양한 군에서는 대조군의 0.261 \pm 0.073 Absorbance에 비하여 1 μ g/ml에서는 0.324 \pm 0.080 Absorbance, 10 μ g/ml에서는 0.409 \pm 0.114 Absorbance, 50 μ g/ml에서는 0.527 \pm

0.152 Absorbance, 100 μ g/ml에서는 0.582 \pm 0.183 Absorbance, 200 μ g/ml에서는 0.704 \pm 0.238 Absorbance로 24시간 처리시와는 달리 모든 농도에서 증가하는 경향을 보였으며, 모

든 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이($P<0.01, P<0.05$)를 나타내었다(Table 2, Fig 2 참조).

치주인대세포에 상피성장인자를 주입 후 72 시간 동안 배양한 군에서는 대조군의 0.154 ± 0.005 Absorbance에 비하여 17ng/ml 에서는 0.150 ± 0.007 Absorbance, 107ng/ml 에서는 0.248

± 0.024 Absorbance, 507ng/ml 에서는 0.213 ± 0.011 Absorbance, 1007ng/ml 에서는 0.281 ± 0.025 Absorbance, 2007ng/ml 에서는 0.277 ± 0.033 Absorbance로 24시간에서와 유사한 경향의 증가 양상을 나타내었으며 48시간에 비해 증식능이 전반적으로 감소되는 경향을 나타내었으며, 17ng/ml 를 제외한 모든 실험군에

Table 3. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts(HGF) and human periodontal ligament cells(PDL) cultured for 24 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants

Conc.(ng/ml)	DNA synthetic activity(Absorbance $A_{405\text{nm}}/A_{490\text{nm}}$)	
	HGF(mean \pm S.D.)	PDL(mean \pm S.D.)
0	0.253 ± 0.051	$0.145 \pm 0.014^{**}$
1	0.252 ± 0.070	$0.160 \pm 0.011^*$
10	0.338 ± 0.082	$0.220 \pm 0.018^*$
50	0.416 ± 0.054	$0.218 \pm 0.113^{**}$
100	0.437 ± 0.071	$0.219 \pm 0.018^{**}$
200	0.530 ± 0.044	$0.216 \pm 0.013^{**}$

*significantly different from control value ($P<0.05$)

**significantly different from HGF ($P<0.01$)

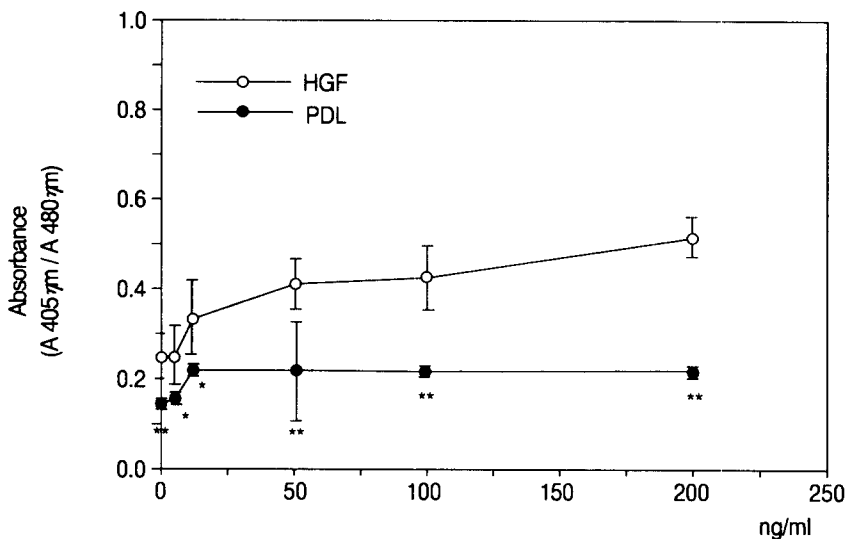


Fig 3. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells cultured for 24 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants.

*significantly different from HGF($P<0.05$)

**significantly different from HGF($P<0.01$)

서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이 ($P<0.01$)를 나타내었다(Table 2, Fig 2 참조).

3. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식능에 대한 비교

상피성장인자의 적용에 따른 치주인대세포

와 치은섬유아세포의 증식능은 24시간 동안 배양시에 모든 실험군에서 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 조금 더 낮은 경향을 나타내었으며, 두 세포의 상호간에도 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이($P<0.01$)를 나타내었다(Table 3, Fig 3 참조).

48시간 동안 배양시에는 모든 실험군에서

Table 4. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts(HGF) and human periodontal ligament cells(PDL) cultured for 48 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants

Conc.(ng/ml) (mean±S.D.)	DNA synthetic activity(Absorbance A_{405nm}/A_{490nm})	
	HGF (mean±S.D.)	PDL
0	0.212±0.030	0.261±0.073
1	0.259±0.029	0.322±0.080
10	0.353±0.016	0.409±0.114
50	0.496±0.045	0.527±0.152*
100	0.523±0.084	0.583±0.183**
200	0.617±0.075	0.704±0.238

*significantly different from HGF ($P<0.05$)

**significantly different from HGF ($P<0.01$)

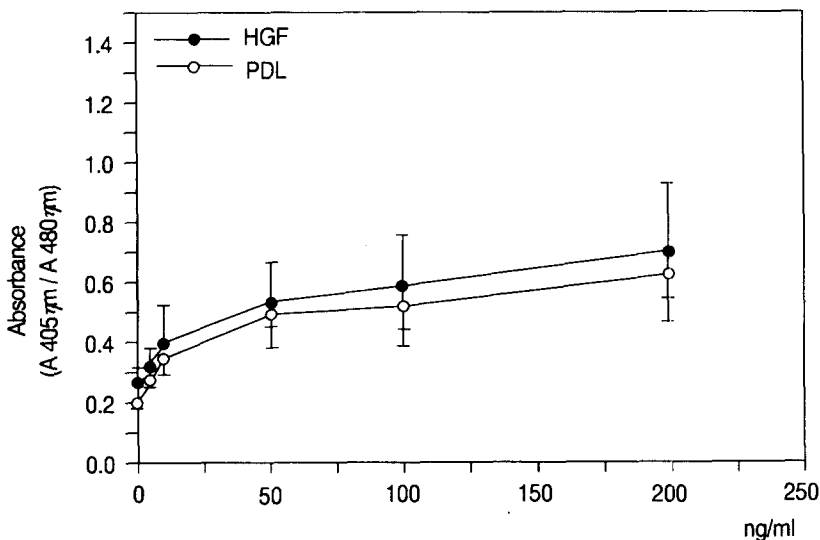


Fig 4. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells cultured for 48 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants.

치주인대세포가 치은섬유아세포보다 증식능이 더 높은 경향을 나타내었으며, 두 세포의 상호간에 통계적으로 유의한 차이(P<0.01, P<0.05)는 나타내지 않았다(Table 4, Fig 4 참조).

72시간 동안 배양시에는 1 g/ml까지 치주인대세포가 더 낮은 경향을 보이다가 107g/ml

이상에서는 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 증식능이 더 높은 경향을 나타내었으며, 두 세포 상호간에 1, 10, 1007g/ml를 투여한 실험군에서 통계적으로 유의한 차이(P<0.01, P<0.05)를 나타내었다(Table 5, Fig 5 참조).

Table 5. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human gingival fibroblasts(HGF) and human periodontal ligament cells(PDL) cultured for 72 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants

Conc. (ng/ml)	DNA synthetic activity(Absorbance A _{405nm} /A _{490nm})	
	HGF (mean±S.D.)	PDL (mean±S.D.)
0	0.162±0.042	0.154±0.005
1	0.181±0.031	0.150±0.007**
10	0.155±0.082	0.248±0.024 **
50	0.198±0.100	0.213±0.011
100	0.174±0.119	0.281±0.025**
200	0.266±0.123	0.277±0.033

*significantly different from HGF(P<0.05)

**significantly different from HGF(P<0.01)

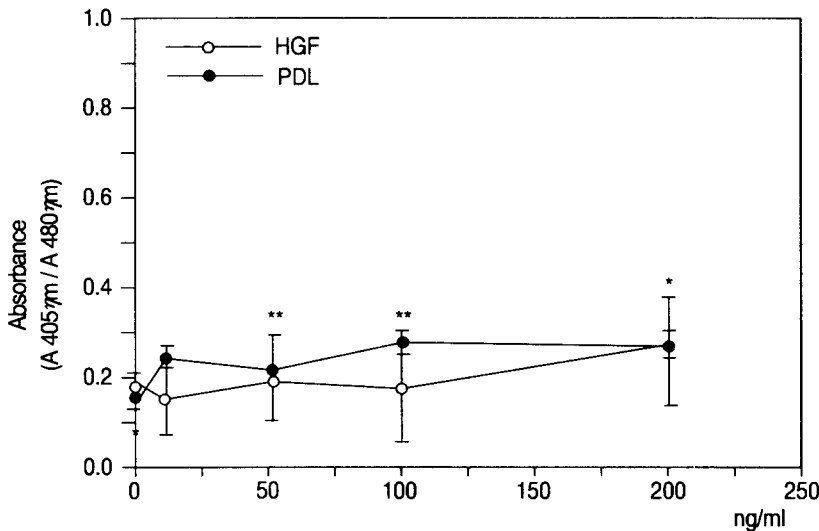


Fig 5. Dose-response effect of epidermal growth factor on DNA synthetic activity in human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts cultured for 72 hours in the presence of 1% fetal bovine serum. Each value represents the mean and S. D. of five determinants.

*significantly different from HGF (P<0.05), **significantly different from HGF (P<0.01)

IV. 총괄 및 고안

치주조직의 치유부에는 4가지 다른 형태의 세포 즉 치은상피세포, 치은결체조직세포, 골세포 및 치주인대세포 등이 이주해 올 수 있으며 치근면으로 이주하는 세포의 표현형에 따라 치주조직의 치유 형태가 결정된다고 할 수 있다¹⁻³⁾. 이들 중 치은섬유아세포는 치은결체조직내에 존재하는 세포의 약 65% 내지 85%를 차지하고 미분화중배엽세포로부터 분화되어 여러 가지 섬유가 결합조직의 세포 기질을 생성하며 DNA와 단백질도 생성함으로서 치주조직의 치유에 관여하고 있다⁴⁰⁾. 또한 치주인대세포는 섬유아세포, 조골세포, 파골세포, 백악아세포, 미분화중배엽세포들을 함유하고 있으며 치주인대세포만이 기능적으로 배열된 샤프스섬유가 신생백악질과 치조골에 삽입되는 신부착을 형성하여 치주조직의 재생에 기여한다고 알려져 있다^{6, 41)}. 그러므로 치주조직의 재생을 위해서는 치주인대세포가 치유부의 다른 세포들보다 선행하여 이주하는 것이 중요하며 이를 조절하는 인자로 성장인자가 관심의 대상이 되고 있다¹⁵⁾.

미분화중배엽세포의 분화에 관여하는 성장인자중 상피성장인자는 신경성장인자의 연구과정중 우연하게 쥐의 약하선에서 처음으로 발견되었고 그 외에 Brunner's gland, 혈액, 중추신경계, 양수 등에도 존재하는 것으로 알려져 있으며 그 후 사람의 뇌에서도 발견이 되어 urogastone이라 명명하였으며 그 구조와 역할에 대해서도 많은 연구가 이루어져 왔다^{17, 18)}. 상피성장인자의 아미노산 배열과 70% 유사한 구조를 가진 urogastone은 상피성장인자와 화학적, 물리적 성질이 완전히 일치하지는 않지만 생체실험 및 시험관적 실험에서 동일한 생물학적 반응을 나타내며 표적세포의 특정한 세포막 수용체와 결합하기 위해 상피성장인자와 경쟁작용을 하는 것으로 밝혀져 있으나 그 기전에 대해서는 정확히 알

려진 바가 없다^{19, 20)}.

상피성장인자는 6045Da의 분자량과 53개의 아미노산 가닥으로 연결되어 있으며 내산성과 내열성을 가지는 펩타이드²⁰⁾로서 다양한 세포와 기관에 대한 성장과 분화에 관여할 뿐만 아니라 상처치유를 촉진시키며 치아의 조기맹출, 각막상피의 성장과 치유의 촉진, 위산 분비 억제에 의한 위염의 치유 촉진과 위점막의 보호작용 등과 같은 다양한 기능을 나타내는 것으로 알려져 있으나²⁴⁻²⁹⁾ 지금까지 치주조직 치유에 관여하는 세포들에 미치는 영향은 잘 규명되어 있지 않아 상피성장인자를 선택하여 본 실험에 사용하였다.

상피성장인자 수용체에 관한 연구를 살펴보면 Cho 등⁴²⁾은 쥐에서 ¹²⁵I-상피성장인자를 이용한 상피성장인자 수용체에 대한 연구에서 백악아세포의 분화 시에는 아주 적은 양이 관찰되었으나, 치주인대 섬유아세포에서는 미분화된 혈관주위세포와 여포주위간엽세포에 많은 수용체가 관찰되었다고 보고하였고, Cho 등⁴³⁾은 쥐의 치주인대, 연골전구세포, 골전구세포에서의 상피성장인자 수용체에 관한 비교 실험에서는 3가지세포 모두에서 많은 양이 관찰되었으나 연골전구세포, 조골전구세포는 분화가 일어나면서 그 수가 급격히 감소되어 완전히 분화된 골아세포와 연골세포에서는 전혀 발견되지 않았다고 보고하였다. Matsuda 등⁴⁴⁾은 치주인대 섬유아세포는 많은 상피성장인자 수용체를 함유하고 있으며 dexamethasone의 영향하에서 무기질조직 형성세포로 분화가 일어나면서 그 수가 감소한다고 보고하였다.

상피성장인자의 적용농도에 따른 세포 증식에 관한 연구에 대해 살펴보면 Canalis 등³²⁾은 태서두개관 조직배양세포에 상피성장인자를 투여한 실험 결과 0.1-10ng/ml의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 DNA합성이 증가한다고 하였으나 cortisol과 혼합사용시에는 증식능이 억제된다고 보고하였다. Hata 등³⁵⁾

은 MC3T3-E1 cell에 100ng/ml의 상피성장인자를 투여한 후 4일간 배양하였을 때 대조군에 비해 세포증식율이 5배정도 증가한다고 보고하였다. Matsuda 등³⁸⁾은 여러 가지 성장인자가 쥐의 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향에 관한 실험에서 상피성장인자를 0.1, 1, 10ng/ml 투여시 10ng/ml에서 약간의 DNA합성증가를 보였으며 상피성장인자를 혈소판유래성장인자-AB, 인슐린유사성장인자-1과 각각 혼합 투여시에는 단독투여 하였을때보다 2배 이상 합성양이 증가하였으나, 변형성장인자- β 와의 혼합사용시에는 오히려 증식능을 억제한다고 보고하였다. Hiramatsu 등³⁹⁾은 태서두개관세포에 상피성장인자를 적용시 0.4ng/ml에서 50ng/ml까지 농도의존형으로 세포증식이 증가한다고 보고하였다. 최 등³⁹⁾은 치은섬유아세포에 상피성장인자가 미치는 영향에 대한 실험에서 0.1ng/ml에서 500ng/ml의 농도변화에 따른 결과를 보면 10%FBS 하에서는 변화를 보이지 않았으나 0.2%의 낮은 FBS 농도에서는 농도변화에 따라 DNA합성이 증가한다고 하였으며 0.1ng/ml에서 10ng/ml의 농도에서는 DNA합성이 증가하나 높은 농도(100-500ng/ml)에서는 오히려 감소한다고 하였고, 또한 치은섬유아세포수가 각각 한 well당 5×10^3 cell/ml와 2×10^4 cell/ml에서의 세포증식 효과의 비교시 세포가 밀생상태일수록 세포증식에 더 많은 농도의 상피성장인자가 필요하다고 보고하였다. 본 실험에서 상피성장인자를 치은섬유아세포군 및 치주인대세포군에 적용시 나타난 결과는 대조군에 비하여 전반적으로 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였으며 각기 다른 조직의 세포에 상피성장인자를 적용하여 나타난 결과와 비교하였을 때 낮은 농도(0.1-50ng/ml)에서는 양적인 차이는 있으나, Matsuda 등³⁸⁾의 연구결과와 그 양상이 유사하게 나타났다. 그러나, 고농도(100-200ng/ml)에서도 계속된 증가를 보여 고농도에서는 증

식능이 오히려 감소한다고 한 최 등³⁹⁾의 보고와는 다른 경향을 나타내었으며 고농도에서의 변화에 대한 좀 더 세밀한 연구와 분석이 필요할 것으로 사료되어진다.

상피성장인자의 적용시간에 따른 세포 증식에 관한 연구에 대해 살펴보면 Canalis 등³²⁾은 태서두개관 조직배양세포에 상피성장인자를 투여한 실험에서 18시간 후 최고치를 나타내다가 96시간까지 증식율이 서서히 감소한다고 하였다.

Turkington 등³⁰⁾은 쥐의 유선세포의 성장에 미치는 영향에 관한 실험에서 상피성장인자를 투여한 경우 대조군에 비해 24시간 후 3-4배의 DNA합성의 증가를 보였다고 보고하였다. Huey 등³⁷⁾은 상피성장인자가 사람의 치은섬유아세포의 활성화에 미치는 영향에 관한 실험에서 0.2%의 FBS와 10ng/ml의 상피성장인자를 같이 적용하였을 경우 0.2% FBS만 적용한 경우보다 DNA합성양의 많은 증가를 나타내었고 시간 경과에 따른 변화로는 18시간 후 부터 반응을 나타내기 시작해서 30시간 후에는 최고치를 나타내었으며 그후에는 서서히 감소하는 경향을 보였다고 보고하였다. 최³⁹⁾ 등은 사람의 치은섬유아세포에서 24, 48, 72시간 상피성장인자를 투여시 시간이 경과할수록 세포증식이 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서는 치은섬유아세포에 상피성장인자를 주입후 24, 48, 72시간 동안 배양시 각시간 별로 농도의존형으로 증가하는 경향을 보였으며 48시간까지 세포의 증식능이 증가 하였다가, 72시간 배양시에는 24, 48시간 배양시에 비해 증식능이 전반적으로 감소하는 경향을 보였다. 또한 치주인대세포에 상피성장인자를 주입후 24, 48, 72시간 동안 배양시에는 48시간 주입시까지 증식능이 증가하였다가 72시간에서는 감소하는 양상을 보였다. 이 결과는 다른 조직의 세포에 상피성장인자를 적용하였을 때 세포증식이 어느 정도까지는 증가하다가 그 후로는 서서히 감소하는 것과 유사

한 양상을 보였으나 발현시기와 증가된 양에 있어서는 다소 차이가 있었으며, 최³⁹⁾ 등의 연구에서 FBS의 농도변화와, 세포의 밀생도에 따라 세포증식이 변화하는 것으로 보아 사용된 세포의 종류와 초기 접종한 세포의 수, 세포배양기간 및 세포주기를 정지시킬 때 사용한 FBS의 농도등의 실험방법 차이에 그 원인이 있다고 사료되어진다.

상피성장인자의 적용에 따른 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식능은 24시간 동안 배양시에 모든 실험군에서 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 더 낮은 경향을 나타내었으나, 48시간 동안 배양시에는 모든 실험군에서 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 증식능이 더 높은 경향을 나타내었으며 72시간 동안 배양시에는 17g/ml까지 치주인대세포가 더 낮은 경향을 보이다가 107g/ml이상에서는 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 증식능이 더 높은 경향을 나타내었다. 이러한 경향으로 보아 치주인대 섬유아세포는 많은 상피성장인자 수용체를 함유하고 있으며 무기질 조직 형성세포로 분화가 일어나면서 그 수가 감소한다고 한 Matsuda⁴⁴⁾의 수용체에 관한 연구결과에 비추어 볼때 시간이 경과할수록 상피성장인자가 치은섬유아세포보다 치주인대세포의 증식능에 더 영향을 미칠 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 상피성장인자가 전반적으로 농도의존형으로 치은섬유아세포 및 치주인대세포의 증식능을 증가시킴으로써 치주조직재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료되나 상처치유등에 중요한 세포외기질 합성에 대해 상피성장인자가 각 세포에 미치는 영향과 세포의 활성화도에 미치는 발현시간, 다른 성장인자와의 상호관계, 최적의 세포증식을 유도할 수 있는 적용환경 등에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

성장인자 가운데 미분화중배엽세포의 활성을 조절하는 것으로 알려진 상피성장인자를 초기배양한 치주인대세포와 치은섬유아세포에 각기 다른 농도와 시간에 따라 주입하였을 때 두 세포의 세포증식능에 미치는 영향을 알아보고 각 조건에 따른 두 세포간의 증식능을 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 상피성장인자를 주입시키지 않은 군을 대조군으로 하고, 상피성장인자를 각각 1, 10, 50, 100, 2007g/ml로 주입시킨 군을 실험군으로 하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였으며, 각 시간별 배양 6시간 전에 10 μ /200 μ 의 5-Bromo-2'-deoxy-uridine을 첨가하여 5-Bromo-2'-deoxy-uridine이 DNA내로 편재되는 양으로써 두세포군의 증식능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

치은섬유아세포에 상피성장인자를 주입 후 24, 48, 72시간 동안 배양시 각 시간별로 농도의존형으로 증가하는 경향을 보였으며 48시간까지 세포의 증식능이 증가 하였다가, 72시간 배양시에는 24, 48시간 배양시에 비해 증식능이 전반적으로 감소하는 경향을 보였다. 24시간 배양시에는 1, 107g/ml를 제외한 모든 실험군에서, 48시간 동안 배양시에는 1 g/ml를 제외한 모든 실험군에서, 72시간 배양시에는 1, 10, 100 g/ml를 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이 (P<0.01, P<0.05)를 나타내었다.

치주인대세포에 상피성장인자를 주입후 24, 48, 72시간 동안 배양시 24시간에서는 농도의존적으로 미약한 증가를 보이다가 2007g/ml에서 감소하는 경향을 보였으며, 48시간에서

는 농도의존적으로 증가하다가 72시간에서는 24시간과 유사한 양상을 보였다. 24, 72시간 배양에서는 48시간 배양에 비해 증식능이 감소하는 경향을 보였다. 24, 48, 72시간 배양시 모두에서 17g/ml를 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이 ($P<0.01$, $P<0.05$)를 나타내었다.

치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식능을 비교해 보면, 24시간 배양시에 모든 실험군에서 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 조금 더 낮은 경향을 나타내었고, 두 세포 상호간에도 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이 ($P<0.01$)를 나타내었다. 48시간 배양시에는 모든 실험군에서 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 증식능이 더 높은 경향을 나타내었으며, 두 세포 상호간에 통계적으로 유의한 차이 ($P<0.01$, $P<0.05$)는 나타내지 않았다. 72시간 배양시에는 17g/ml까지 치주인대세포가 더 낮은 증식율을 보이다가 107g/ml 이상에서는 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 그 증식능이 더 높은 경향을 나타내었으며, 두 세포 상호간에 50, 2007g/ml를 제외한 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이 ($P<0.01$, $P<0.05$)를 나타내었다.

참고문헌

1. Lindhe, J. : Textbook of Clinical Periodontology, 2nd ed., Munksguard, copenhagen(1989), p450
2. The American Academy of Periodontology : Proceedings of the world workshop in clinical periodontics, V-20, 1989.
3. Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissues, J Periodontol., 47 : 256~60, 1976.
4. Stahh, S.S. : Repair potential of the soft tissue-root interface, J. Periodontol., 48 :

- 545~552, 1977.
5. Caton, J., Nyman, S. and Zander, H. : Histometric evaluation of periodontal surgery. : II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures, J. Clin. Periodontol., 7 : 224~231, 1980.
6. Polson, A.M. : The root surface and regeneration : Present therapeutic limitations and future biologic potentials, J. Clin. Perio-dontol., 13 : 995~999, 1986.
7. Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Platen, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue, J. Clin. Periodontol., 7 : 394~401, 1980.
8. Karring, T., Nyman, S., Lindhe, J. and Sirirat, M. : Potentials for root resorption during periodontal wound healing, J. Clin. Periodontol., 11 : 41~52, 1984.
9. Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into bone tissue, J. Clin. Periodontol., 7 : 96~105, 1980.
10. Andreasen, J. O. : Periodontal healing after replantation and autotransplantation of permanent incisors, Int. J. Oral Surg., 60 : 54~61, 1981.
11. 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.
12. 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.

13. Beertsen, W. and Everts, V. : The site of remodelling of collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor, *Anat. Rec.*, 189 : 479~498, 1977.
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. 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.
16. Graves, D.T. and Cochran, D.L. : Mesenchymal cell growth factors, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1 : 17~36, 1990.
17. Cohen, s. Epidermal growth factor (EGF) : historical perspectives in *Hormonal Proteins and Peptide*. Vol.12. Li, C, H.,Ed., Academic Press.New York., 12 : 299, 1984.
18. Cohen, s. : Epidermal growth factor(EGF). *Cancer.*, 51 : 1787-1791, 1983.
19. Harper, R. A., Pierce, J. and Savage, C. R., Jr. : Purification of human epidermal growth factor by monoclonal antibody affinity chromatography, *Methods. Enzymol.*, 146 : 3, 1987.
20. Cohen, s., Carpenter, G. and Lembach, K. J. : Interaction of epidermal growth factor(EGF) with cultured fibroblasts, *Adv. Metab. Disorders.*, 8 : 265, 1975.
21. Marti, U., Burwen, S. J. and Jones, Á. L. : Biological effects of epidermal growth factor with emphasis on the gastrointestinal tract and liver and update. *Hepatology.*, 9 : 126, 1989.
22. Taylor, J. M., Mitchell, W. M., Cohen, S. J. : *Biol. Chem.*, 247 : 5928-34, 1972.
23. Carpenter, G., Cohen, S. : Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem.*, 48 : 193-216, 1979.
24. Buckley, A., Davison, J. M., Kamerath, D. C., Wolt, T. B. and Woodward, S. C. : Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 : 7340, 1985.
25. Laato, M., Kahari, V., Ninikoski, J. and Buorio, E. : Epidermal growth factor increase collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes, *Biochem. J.*, 247 : 385, 1987.
26. Tsutsumi, O., Tsutsumi, A., Oka, T. : Epidermal growth factor-like corneal wound healing substance in mouse tears, *J. Clin. Invest.*, 81 : 1067-1071, 1988.
27. Culbertson, W.W., Schantzlin, D., West, C., Dawson, C., Gospodarowicz, D., and Kramer, S. G. : The effect of epithelial growth factor on corneal epithelial defects, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.(Suppl.)*, 19 : 74, 1980.
28. Olsen, P.S. : Role of epidermal growth factor in gastroduodenal mucosal protection, *J.Clin. Gastroenterol.*, 10 : 5146, 1988.
29. Itoh, M., Joh, T., Imai, S., Miyamoto, T., Matsusako, K., Iwai, A., Katsumi, K., Endo, K., Goto, K. and Takeuchi, T. : Experimental and clinical studies on epidermal growth factor for gastric

- mucosal protection and healing of gastric ulcers, *J. Clin. Gastroenterol.*, 10 : 57, 1988.
30. Turkington, R.W. : The role of epithelial growth factor in mammary gland development in vitro, *Exp. Cell. Res.*, 57 : 79, 1969.
 31. Tashjian, A. aj., Jr. and Levine, L. : Epidermal growth factor stimulates prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85 : 966, 1978.
 32. Canalis, E. and Raisz, L.G. : Effect of epidermal growth factor on bone formation in vitro, *Endocrinology.*, 10 : 4862, 1979.
 33. Hiramatsu, M., Kumegawa, M., Katakeyama, K., Yajima, T., Mimami, N. and kodama, H. : Effect of epidermal growth factor on collagen synthesis in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria, *Endocrinology.*, 111 : 1810, 1982.
 34. Canalis, E. : Effects of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae, *Metabolism.*, 32 : 14, 1983.
 35. Hata, R.I., Hori, H., Nagai, Y., Tanaka, A., Kondo, M., Kiramatsu, M., Utsumi, N., and Kumegawa, M. : Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor, *Endocrinology.*, 115 : 867, 1984.
 36. Patanen, AM., Thesleff, I. : Localization and quantitation of ¹²⁵I epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissue at different developmental stages, *Dev. Biol.*, 120 : 186-197, 1987.
 37. Huey, J., Narayanan, S., Jones, K. and Page, R., C. : Effect of epidermal growth factor in the synthetic activity of human fibroblast, *Biochem. Biophys. cta.*, 632 : 227-233, 1980.
 38. Matsuda, N., Lin, W.L., Kumar, N.M., Cho, M.I. Genco, R.J. : Mitogenic, chemo tactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, *J. Periodontol.*, 63 : 515-525, 1992.
 39. Choi, J.Y., Lee, B.H., Ryoo, H.M., Sung, J.H., Kim, I.S., Sohn, K.Y., Jo, J.S. : Effect of Epidermal growth factor on collagen production in human gingival fibroblast, *Korean. J. Biochem.*, 27 : 1-7, 1995.
 40. Mariotti, A. and Cochran, D. L. : Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva, *J. Periodontol.*, 61 : 103-111, 1990.
 41. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승. : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교, *대한구강생물학회지.*, 15 : 14-28, 1991.
 42. Cho, M.I., Lin, W.L. and Garant, P.R. : Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat, *Anat.Rec.*, 231 : 14-2, 1991.
 43. Cho, M.I., Farant, P.R., and Lee, Y.L. : Periodontal ligament fibroblasts, preosteoblasts, and prechondocytes express receptor for epidermal growth factor in vivo : a comparative radioautographic

- study, J. Periodont. Res., 23 : 287-294, 1988.
44. Matsuda, N., Akumar, N.M., Ramakrishnan, P.R., Lin, W.L., Genco, R.J. and Cho, M.I. : Evidence for up-regulation of epidermal growth factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype in vitro, Arch. oral. Biol., 38 : 559-569, 1993.

The Effect of EGF on Proliferation Rate of the Human Periodontal Ligament Cells and Human Gingival Fibroblasts

Seon-Woo Kim, Jae-mok Lee, Jo-Young Suh

Department of Priondontology, College of Dentistry, Kyungpook National University

Epidermal growth factor(EGF) is one of polypeptide growth factors. EGF has been reported as a biological mediator which regulates activities of wound healing process including the cell proliferation, migration and metabolism.

The purposes of this study is to evaluate the effects of EGF on the human periodontal ligament cells and human gingival fibroblast cells that promote regeneration of periodntal tissue. The mitogenic effects of epidermal growth factor on human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts were evaluated by determining the incorporation of 5-Bromo-2'-deoxy-uridine into DNA of the cells in a dose dependent manner.

The prepared cells were the primary cultured gingival fibroblast and periodontal ligament cells from humans, the fourth or sixth subpassages were used in the experiments.

Cells were seeded in DMEM containing 10% FBS. 1, 10, 50, 100, 200 μ g/ml and epidermal growth factor were added to the quiescent cells for 24 hours, 48 hours and 72 hours.

They were labeled with 10 μ l/200 μ l 5-Bromo-2'-deoxy-uridine for the last 6 hours of each culture. The results of the five determinants were presented as mean and S.D..

The results were as follows :

The DNA synthetic activity of human gingival fibroblasts were increased dose dependently by epidermal growth factor at 24 hours, 48 hours and 72 hours. The mitogenic effects were similar at the 24 and 48 hours of epidermal growth factor, but the DNA synthetic activity of human gingival fibroblasts generally decreased at 72 hours.

The DNA synthetic activity of human periodontal ligament cells were increased dose dependently by epidermal growth factor at 24 hours but the DNA synthetic activity decreased at 200 μ g/ml of each hour. Generally the maximum mitogenic effects were observed at the 48 hours application of epidermal growth factor. The DNA synthetic activity of human periodontal ligament cells generally decreased lower at 24, 72 hours than at 48 hours the application of epidermal growth factor.

In the comparison of DNA synthetic activity between human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells, human periodontal ligament cells had slightly higher proliferation activity than human gingival fibroblasts for a longer time at the high dosage of the epidermal growth factor.

In conclusion, epidermal growth factor have important roles in the stimulation of DNA synthesis in human periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts, and thus may be useful for clinical applications in periodontal regenerative procedures.