대한치주과학회지 : Vol. 26, No. 4, 1996

PDGF 함유매개체로서 탈회된 치근면의 효과

우상효, 이재목, 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주질환은 일반적으로 세균에 의해 야기되며, 임상적으로 치은 출혈, 종창, 치주낭형성, 치아동요, 및 치조골 파괴 등의 증상을 나타내며, 성인에게서 치아 상실의 주된 요인이 되고 있다. 과거의 치주 치료는 질환 진행의 저지, 차단에 목적을 두었으나, 최근에는 소실된 치주조직의 재생에 그 목적을 두고 있다.

치주조직 치유에 관여하는 세포는 치은상피세포, 치은결체조직세포, 치조골세포, 및 치주인대세포가 있으며[1] 이는 각각 긴 접합상피세포에 의한 부착[2, 3], 치근흡수[4, 5], 골유착[6, 7], 및 신부착[8, 9]의 다른 치유양상에 관여한다고 보고되어, 치주인대세포가 치주조직 재생에 중요한 요인으로 직접적인 관여를 한다고 여겨지고 있다. 그러므로 치주조직 재생을 위해서는 세균에 감염된 치근면 처치, 치은상피조직 배제, 치주인대세포의 증식 등이 중요하며, 이를 위해 치근면 처치술[10, 11], 치관변위판막술[12, 13], 조직유도재생술[14, 15], 및 성장인자 적용[16, 17, 18] 등이 이용되고 있다.

치근면 처치는 치주조직 재생을 위한 조건형성을 위해 오래 전부터 치주과학영역에서 이용되어 왔다. Boyko 등[19]은 비탈회면보다 탈회면에서 더 많은 세포부착이 있음을 보고하였고, Pitaru와 Melcher[20]는 탈회면이 섬유아세포의 부착, 이주를 쉽게 하고 일정한 방향의 섬유성부착을 일으킨다고 하였다. 이를 위해 주로 pH 1의 구연산(citric acid, CA)과 테트라사이클린(tetracycline, TC)이 치근면 탈회에 이용되며, 치근면에 구연산 도포시 치근면 탈회에 따른 백악질 형성과 신부착을 야기하지만, 치근활택이 되지 않은 치근면에서는 효과가 없다고 보고되고 있다. 그 외 치근면 탈회효과로는 치근면의 내독소 제거[21], 도말층 제거[22], 상아세관 및 교원질 노출[23], 상피세포의 하방증식 억제[29], 섬유아세포의 증식과 안정화[19], 그리고 초기 혈병 유지[24] 등에 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 이들 효과를 얻기 위한 구연산 pH는 1-1.42가 최적이며, 적용 시간은 2-3분 정도로 보고되고 있다. 그러나 구연산 처리시 치근흡수, 골강직과 신생백악질 형성이 저하되는 결과가 초래되어 구연산이 치주인대세포에 손상을 줄 가능성이 있음이 보고된[25] 바 있다. 테트라사이클린 역시 구연산과 유사한 효과를 나타내며 그 외 교원질분해효소의 활성을 저해[26]하며, 골이식 효과를 증진시키고[27, 28], 구연산보다 섬유아세포 부착에 있어서 3배 이상

의 효과가 있다고 보고[30] 되었다. 그러나 역시 구연산처럼 치근흡수와 골강직의 가능성도 배제할 수 없는 것으로 알려지고[31] 있다.

또한 각종 세포의 고유성상이 규명되고, 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외 기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자(polypeptide growth factors, PGFs)에 의해 조절[32]되어지며, 성장인자가 치주조직 재생에 중요한 역할을 할 수 있다고 보고된 후 많은 관심을 가지게 되었다. 이들 많은 성장인자중 혈소판유래성장인자(platelet derived growth factor, PDGF), 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 변형성장인자(transforming growth factor, TGF), 상피성장인자(epidermal growth factor, EGF), 그리고 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1) 등이 창상치유에 관여하며, 이 중 PDGF는 섬유아세포, 신경세포, 평활근세포, 골세포 등 중배엽세포의 성장과 증식을 조절하는데 중요한 역할을 한다. PDGF는 주로 혈소판의 α-granule에서 분비되며, 그 외 다수 세포[33~36]에서도 분리되는 물질로 등전점(pI) 9.8과 30kDa의 분자량을 가지는 조절성 단백질이며, 크게 단종이량체(PDGF-AA, BB)와 이종이량체(PDGF-AB)로 나누어지고, α와 β의 2가지 종류의 수용기를 가진다. 치주과학 영역에서는 Lynch 등[16, 18]이 PDGF-BB와 IGF-I를 병용사용시 치주 결손부에서 치주부착[16]과 Implant 주위골 결손에서 골재생 촉진[18]을 보고하였고, Matsuda 등[37]은 쥐의 치주인대세포에 PDGF-BB를 적용시 세포의 증식, 화학주성, 교원질 합성을 증가시킨다고 보고하였다. 그리고 Oates 등[38]은 PDGF-AA, BB가 인간의 치주인대세포 증식을 조절하는 주된 역할을 한다고 하였고, Cho 등[41, 42]은 구연산 처리 후 조직유도재생술과 PDGF-BB를 병용 사용시 3급 이개부병변에서 치주조직의 재생이 촉진됨을 보고하였다.

그러나 이런 PDGF 등 성장인자의 치주조직 재생촉진에 대해서는 많이 연구되어진 반면, 액체상태인 성장인자를 치주조직 재생에 이용하는데 있어서 적용 방법의 어려움이 있으며, 이를 해결하기 위해 methylcellulose gel[16, 18], 교원질[39, 40] 등 여러 종류의 성장인자 함유매개체(growth factor Carrier)를 사용하는 방법이 있으나, 이들은 각기 적용에 있어서 상처치유나 성장인자의 반감기에 영향을 줄 수 있는 문제점이 지적되고 있다. 또 다른 적용 방법으로는 Cho 등[41, 42]이 주장한 탈회된 치근면을 이용하는 것으로, 탈회된 치근면에 성장인자를 적용시. 성장인자가 장시간 서서히 유리된다고 보고하여, 탈회된 치근면이 성장인자의 저장소 역할을 할 수 있을 것이라고 시사된 바 있다.

그러나 탈회된 치근면에 도포된 성장인자가 어느 정도 치주조직 재생에 작용하는 지에 대한 연구는 아직 미미하여 본 실험에서는 구연산과 테트라사이클린으로 탈회시킨 치근면에 도포된 PDGF-BB가 일차 배양한 치은섬유아세포의 부착과 증식에 미치는 영향 및 탈회된 치근면에 도포된 PDGF-BB의 용출액을 이용하여 72시간동안 치은섬유아세포를 배양, 성장인자의 유리기간을 측정해 봄으로써 탈회된 치근면과 성장인자의 사용이 치주조직재생에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 DMEM으로 표기)을 사용하였고, 그 외 fetal bovine serum (Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)과 penicillin(근화제약, 한국), streptomycin(동아제약, 한국), phosphate buffered saline(이하 PBS로 표기),

ethylenediamine-tetraacetic acid(이하 EDTA로 표기) 등을 사용하였으며, 치근면 탈회물질로는 테트라사이클린(Sigma사, 미국)과 구연산(Junsei사, 일본)을, 성장인자로는 유전자재조합형 PDGF-BB(Genzyme사, 미국)를 사용하였다.

2. 치은섬유아세포배양

교정치료를 목적으로 내원한 환자에서 발거된 소구치의 치은을 절제, 세절하여 배양 접시에 고르게 분포시키고, 10% FBS와 초기 배양과정에서 야기될 수 있는 감염 방지를 위해 100unit/ml penicillin과 100μg/ml streptomycin이 함유된 DMEM에 침수시켜 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 혼합공기를 사용하는 배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 치은섬유아세포가 조직세편에서 증식되어 배양접시를 완전히 피개하는 단층 밀생 상태가 되면 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리, 100mm 세포배양접시에 계대배양하여, 6세대, 7세대의 세포를 본 실험에 사용하였다.

3. 시편 제작

치주질환으로 발거된 치아를 이용하여, 한 부위 치면의 백악질을 완전히 제거하는데 최소 20 strokes가 필요하다는 Caudill 등[43]의 보고에 따라 큐렛으로 최소 20 strokes 이상 철저히 치근활택술을 시행한 후, 치주염에 이환되었던 부위만 carborundum disk를 이용, 치아의 장축방향으로 절단하여 치근절편을 제작하였다.

4. 부착 및 증식 세포수 측정

각 절편을 2개의 대조군(대조군-1, 대조군-2)과 2개의 실험군으로 하여 4개의 군으로 나누었다. 대조군-1은 치근면 탈회와 PDGF-BB 처리없이 절편을 준비하였고, 대조군-2는 절편을 치근면 탈회없이 100ng/ml PDGF-BB에 5분간 침수 후 건조시켰다. 실험군인 TC와 PDGF-BB 처리군은 절편을 100mg/ml TC수용액에 5분간 탈회시킨 후, 그리고 또 다른 실험군인 구연산과 PDGF-BB 처리군은 절편을 pH 1인 구연산에 3분간 탈회 후, 각 절편을 인산완충 생리식염수로 3회 세척하여 건조하는 전처리 과정을 거쳐 역시 100ng/ml PDGF-BB에 5분간 침수 후 건조시켰다. 그 후 각 절편을 24-well 조직배양기에 옮긴 다음 각 시편에 1.0×10^4개의 치은섬유아세포를 가지는 10% FBS가 함유된 배양액 DMEM 1ml씩 넣고 6시간 배양후 다시 각 절편을 새로운 24-well 조직배양기에 옮기고 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 각 배양기의 배양액을 완전히 제거하고 인산완충생리식염수로 세척 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA로 5분간 처리하여 세포를 분리시켜 혈구계산기로 부착 및 증식 세포수를 측정, 단위면적당 세포수를 계산하였다. 부착 세포수는 6시간 배양된 세포를, 증식세포수는 24, 48, 72시간 배양된 세포를 이용하였다.

5. 용출액을 이용한 배양

성장인자의 유리기간 측정을 위해 각 치아 절편을 위의 방법으로 치근활택술, 구연산 처리, 및 TC 처리하였다. 대조군으로는 위와 같이 치근활택술후 치근면 탈회없이 배양액에 5분간 침수시킨 군(대조군-1)과 치근활택술후 200ng/ml PDGF-BB에 5분간 침수시킨 군(대조군-2)으로 하였고, 실험군은 치근활택술 후 위의 방법으로 구연산 혹은 테트라사이클린 처리후 200ng/ml PDGF-BB에 5분간 침수시킨 군으로 하였다. 각 절편을 침수후 PDGF-BB가 없는 새로운 1ml 배양액에 각각 옮겨 침수시켰다. 침수후 1일째 각 배양액을 모두

채취하고, 다시 새로운 배양액 1ml씩을 채워 주었다. 침수 2, 4, 6, 8일째에도 같은 방법으로 배양액을 채취하고, 새로운 배양액으로 교환하였다. 그 후 1.0×10^4개 치은섬유아세포를 24-well 조직배양기에 접종후, 채취한 각 절편의 1, 2, 4, 6, 8일째 배양액을 치은섬유아세포가 접종된 24-well 조직배양기에 넣고, 72시간 배양 후 증식 세포수를 측정하여 성장인자의 유리기간을 측정하였다.

III. 성 적

1. 치근면 탈회후 PDGF-BB 적용이 치은섬유아세포의 부착과 증식에 미치는 영향

치근면 탈회후 PDGF-BB 적용에 따른 치은섬유아세포의 부착수는 대조군-1은 1.19×10^4cells/cm^2이며, 대조군-2는 2.09×10^4cells/cm^2, 테트라사이클린 처리군은 5.35×10^4cells/cm^2, 구연산 처리군은 3.25×10^4cells/cm^2로 테트라사이클린 처리군에서 가장 많은 세포부착을 보였으며, 다음으로 구연산 처리군, 대조군-2, 대조군-1순으로 나타났으며, 테트라사이클린 처리군과 구연산 처리군에서는 접종한 세포보다 많은 수의 세포부착이 있었다. 치은섬유아세포의 증식수는 24, 48, 72 시간 순으로 대조군-1의 경우, 각각 1.83×10^4cells/cm^2, 2.25×10^4cells/cm^2, 2.46×10^4cells/cm^2이며, 대조군-2는 2.13×10^4cells/cm^2, 2.32×10^4cells/cm^2, 2.79×10^4cells/cm^2, 테트라사이클린 처리군은 4.29×10^4cells/cm^2, 13.84×10^4cells/cm^2, 14.67×10^4cells/cm^2, 구연산 처리군에서는 2.96×10^4cells/cm^2, 5.22×10^4cells/cm^2, 4.47×10^4cells/cm^2로 전반적으로 시간 경과에 따라 증가하는 양상을 보였으나, 구연산 처리군에서는 72시간에서의 증식 세포수가 48시간째보다 오히려 감소하였으며, PDGF-BB를 처리한 모든 군에서는 48시간째 특히 테트라사이클린 처리군에서, 현저한 증식율을 보였고, 부착양상과 같이 역시 테트라사이클린 처리군에서 가장 많은 증식 양상을 보였으며, 다음으로 구연산 처리군, 대조군-2, 대조군-1 순으로

Table 1. Effect of demineralization of root surface and application of PDGF-BB on attachment and proliferation of human gingival fibroblasts. Cells were cultured for 6, 24, 48, 72 hours. Number of cell attachment is calculated at 6 hours and number of cell proliferation is calculated at 24, 48, 72 hours. Each value represents the mean and S.D..

	6 hours (mean±S.D.)	24 hours (mean±S.D.)	48 hours (mean±S.D.)	72 hours (mean±S.D.)
Con.-1	1.19±0.61	1.83±1.29	2.25±0.79	2.46±0.69
Con.-2	2.09±0.54#	2.13±0.44	2.32±0.60	2.79±1.33
TC	5.35±0.23**	4.29±1.05**	13.84±2.23**	14.67±3.73**
CA	3.25±0.83**	2.96±0.73**	5.22±1.85**	4.47±0.46**

(단위 : × 10^4cells/cm^2)

Con.-1 : non-demineralization and DMEM
Con.-2 : non-demineralization and PDGF-BB
TC : demineralization with tetracycline and PDGF-BB
CA : demineralization with citric acid and PDGF-BB
: significantly different from con.-1 value ($P<0.05$)
** : significantly different from con.-2 value ($P<0.01$)

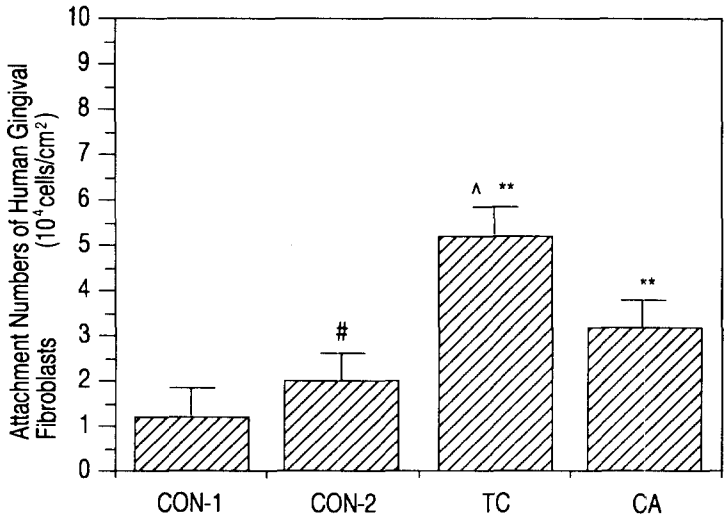

Fig 1. Effect of demineralization of root surface and application of PDGF-BB on proliferation of human gingival fibroblasts. Cells were cultured for 6 hours. Each value represents the mean and S.D..

Con.-1 : non-demineralization and DMEM **Con.-2** : non-demineralization and PDGF-BB **TC** : demineralization with tetracycline and PDGF-BB **CA** : demineralization with citric acid and PDGF-BB **#** : significantly different from con.-1 value ($P<0.05$) **^** : significantly different from CA value ($P<0.05$) ****** : significantly different from con.-2 value ($P<0.01$)

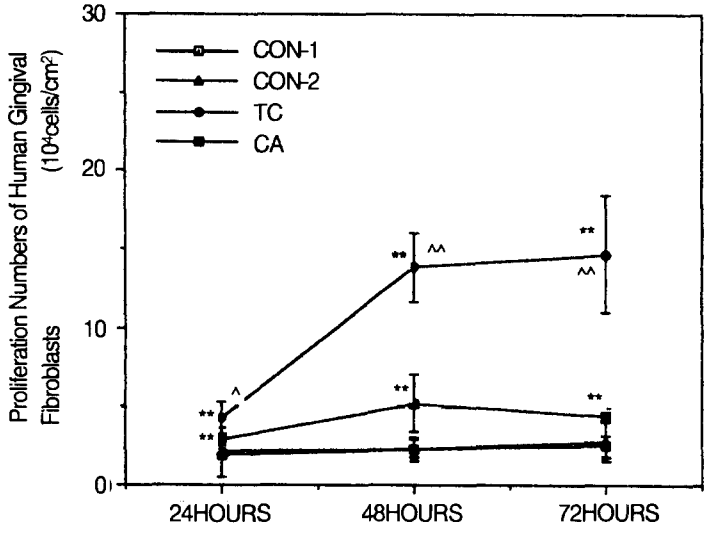

Fig 2. Effect of demineralization of root surface and application of PDGF-BB on proliferation of human gingival fibroblasts. Cells were cultured for 24, 48, 72 hours. Each value represents the mean and S.D..

Con.-1 : non-demineralization and DMEM **Con.-2** : non-demineralization and PDGF-BB **TC** : demineralization with tetracycline and PDGF-BB **CA** : demineralization with citric acid and PDGF-BB ****** : significantly different from con.-2 value ($P<0.01$) **^** : significantly different from CA value ($P<0.05$) **^^** : significantly different from CA value ($P<0.01$)

나타났다(Table 1, Fig 1, 2).

탈회와 비탈회의 비교에서는 부착과 증식 모두에서 탈회군인 테트라사이클린 처리군, 구연산 처리군이 비탈회군인 대조군-2보다 많은 수의 부착 및 증식 양상을 보였으며, 통계학적으로 모두 유의한 차이($P<0.01$)를 보였다(Table 1, Fig 1, 2). 대조군-1과 탈회군의 비교에서도 부착과 증식 모두 탈회군에서 부착과 증식이 증가되는 양상을 보이며, 통계학적으로 유의한 차이($P<0.01$)를 보였다.

탈회 물질 상호간의 비교에서는 테트라사이클린 처리군이 구연산 처리군보다 6시간에서는 2.4배, 24시간째는 1.2배, 48시간에서는 2.5배, 72시간에서는 3.5배의 많은 부착과 증식 양상을 보여, 부착과 증식 모두에서 테트라사이클린 처리군이 우수한 양상을 보이며, 통계학적으로도 모든 시간대에서 유의한 차이($P<0.01, 0.05$)를 보였다(Fig 1, 2).

대조군 상호간의 비교에서는 6시간의 부착에서 대조군-2가 대조군-1보다 더 많은 부착 양상을 보였으며, 통계적으로 유의한 차이($P<0.05$)가 있었으나, 증식에서는 대조군-2가 약간의 많은 증식을 보이나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 1, Fig 1).

2. 용출액을 이용한 세포 배양

각 군의 용출액을 이용하여 72시간동안 치은섬유아세포를 배양시 증식세포수는 대조군-1의 경우 1, 2, 4, 6, 8째 용출액에서 각각 1.20×10^4cells/well, 1.23×10^4cells/well, 1.19×10^4cells/well, 1.15×10^4cells/well, 1.09×10^4cells/well이며, 대조군-2의 경우 1.36×10^4cells/well, 1.14×10^4cells/well, 1.06×10^4cells/well, 1.14×10^4cells/well, 1.12×10^4cells/well이며, 테트라사이클린 처리군에서는 2.26×10^4cells/well, 2.06×10^4cells/well, 1.83×10^4cells/well, 1.71×10^4cells/well, 1.26×10^4cells/well이였고, 구연산 처리군에서는 2.04×10^4cells/well, 1.52×10^4cells/well, 1.40×10^4cells/well, 1.37×10^4cells/well, 1.27×10^4cells/well이었으며, 역시 테트라사이클린 처리군에서 가장 많은 세포 증식을 보였으며, 다음으로 구연산 처리군이었으며, 대조군-1과 대조군-2는 비슷한 수의 증식을 보였고, 전반적으로 탈회군에서는 배양액의 시간 경과에 따라 증식 세포수가 감소하였으나, 대조군에서는 시간에 관계없이 일정한 세포 증식을 보였다. 탈회군인 테트라사이클린 처리군과 구연산 처리군이 비탈회군인 대조군-2보다

Table 2. Proliferation of Human Gingival Fibroblast cultured in each Eleunt for 3 days. Each value represents the mean and S.D..

	1 (mean±S.D.)	2 (mean±S.D.)	4 (mean±S.D.)	6 (mean±S.D.)	8 (mean±S.D.)
Con.-1	1.20±0.20	1.23±0.18	1.19±0.14	1.15±0.09	1.09±0.07
Con.-2	1.36±0.09#	1.14±0.17	1.06±0.05	1.14±0.16	1.12±0.16
TC	2.26±0.07**	2.06±0.33**	1.83±0.12**	1.71±0.33**	1.26±0.17
CA	2.04±0.23**	1.52±0.05*	1.40±0.07**	1.37±0.05*	1.27±0.09

(단위 : × 10^4cells/well)

Con.-1 : non-demineralization and DMEM
Con.-2 : non-demineralization and PDGF-BB
TC : demineralization with tetracycline and PDGF-BB
CA : demineralization with citric acid and PDGF-BB
: significantly different from con.-1 value ($P<0.05$)
***** : significantly different from con.-2 value ($P<0.05$)
****** : significantly different from con.-2 value ($P<0.01$)

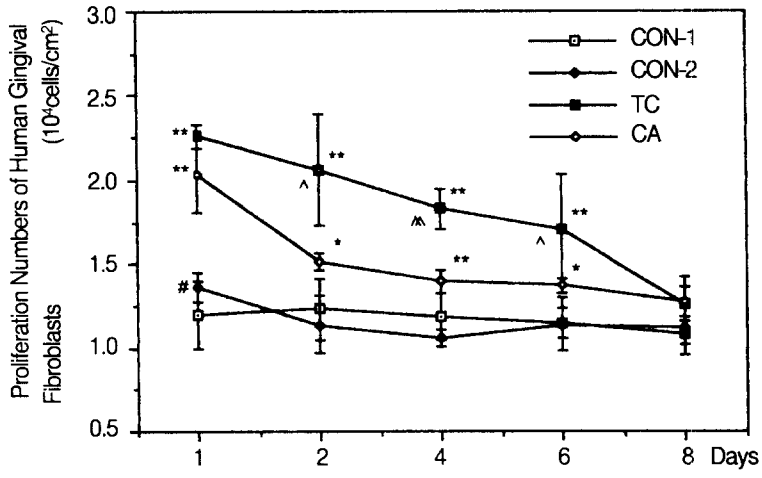

Fig 3. Proliferation of Human Gingival Fibroblast cultured in each Eleunt for 3 days. Each value represents the mean and S.D..

Con.-1 : non-demineralization and DMEM **Con.-2** : non-demineralization and PDGF-BB **TC** : demineralization with tetracycline and PDGF-BB **CA** : demineralization with citric acid and PDGF-BB **#** : significantly different from con.-1 value ($P<0.05$) ***** : significantly different from con.-2 value ($P<0.05$) ****** : significantly different from con.-2 value ($P<0.01$) **^** : significantly different from CA value ($P<0.05$) **^^** : significantly different from CA value ($P<0.01$)

많은 세포 증식을 보였으며, 통계학적으로 6일째 용출액까지 유의한 차이를 보였다($P<0.01$, 0.05) (Table 2, Fig 3). 탈회물질 상호간의 비교에서는 역시 테트라사이클린 처리군이 구연산 처리군보다 더 많은 세포 증식을 보였으며, 2, 4, 6일째 용출액에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였고($P<0.05$, 0.01), 대조군 상호간의 비교에서는 1일째 용출액에서 대조군-2가 대조군-1보다 통계학적으로 유의한 차이($p<0.05$)의 증가를 보였으나, 그 이후의 용출액에서는 차이가 없었다(Table 2, Fig 3).

VI. 고 찰

치주치료의 궁극적인 목적은 파괴된 치주조직 결손부에 신생골과 신생백악질 형성, 그리고 그 사이에 기능적으로 배열된 치주인대가 형성되는 치주조직의 재생이다. 과거의 여러 치료 방법은 대부분 긴접합상피결합[2, 3], 치근흡수[4, 5], 골유착[6, 7] 등의 결과를 초래하여 치주조직재생이라는 원래의 목적을 이룰 수 없었다. 그러나 최근에 치주조직에 관여하는 여러 조직에 대한 성질과, 또한 이들 각 종 세포의 고유성상이 규명되고, 세포의 화학주성이 밝혀지면서 조직치유과정에서 신속한 세포의 이동과 증식이 중요하다는 것이 밝혀지면서 이들 치유에 관여하는 세포의 성상 및 활성을 조절하려는 노력이 시행되어져 왔다. 이러한 연구에서 성장인자가 조절인자로서 중요하다고 알려지고[32] 있고, 현재까지 여러 종류의 성장인자가 밝혀져있으며, 이 중 PDGF가 치주조직치유에 많은 관여를 한다고 보고되고 있다.

PDGF는 Ross 등[44]과 Kohler와 Lipton[45]에 의해 동맥의 평활근 세포의 증식을 자극하는 물질이 혈소판에서 분비됨이 발견되었고, Antoniades 등[46]이 분리, 정제하여 PDGF라고

명명하였다. 그러나 그 이름과는 달리 혈소판 뿐만 아니라 최근에는 단핵세포 및 대식세포[33], 섬유아세포[34], 내피세포[35], 그리고 골기질[36] 등에서도 발견된다고 보고되고 있다. PDGF는 열에 안정적인 단백질로 AA, BB, AB 3가지 형태가 있으며 각각은 세포막의 α, β 수용기에 선택적으로 결합하며, 그 기능은 DNA와 교원질합성, 섬유아세포, 평활근세포에 대한 화학주성 및 유사분열 촉진 등으로 밝혀지고 있다. 치주과학 영역에는 Rutherfold 등[47]이 치수, 치은 및 치주인대세포로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF 효과를 알아본 결과 각 세포의 증식에 유효함을 보고하였고, Graves 등[48]은 치주인대와 치은에서 유래한 섬유아세포에 화학주성과 유사분열 촉진을, Melcher 등[49]은 다공성 타이타늄 합금에서 인간의 치은섬유아세포의 부착을 촉진시킨다고 보고하였다. 그리고 Lynch 등[16, 18]은 PDGF-BB와 IGF-Ⅰ를 병용사용시 치주결손부에서 치주부착16)과 Implant 주위골 결손에서 골재생 촉진[18]을 보고하였고 Cho 등[41, 42]은 구연산 처리후 조직유도재생술과 PDGF-BB를 병용 사용시 3급 이개부병변에서 치주조직의 재생이 촉진됨을 보고하였다.

PDGF의 치주조직 재생에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으나, 그 적용법에 대해서는 아직 규명되지 않거나 정해진 바가 없이 학자에 따라 다양하게 이용되며, 주로 성장인자 함유매개체를 사용한 방법이 이용되고있다. 현재까지 각 종 문헌에 보고된 함유매개체로는 Lynch 등[16, 18]은 methylcellulose gel을, Rutherford 등[39]은 교원질을, Ross 등[50]은 polyethylene glycol과 교원질, Tornes 등[51]은 polyorthoester membrane을 그리고 Russell 등[52]은 porous polysulfone을 사용하였으며, 그 외 tricalciumphosphate(TCP)[40], fibronectin[53], 탈회동결건조골[54] 등을 이용한 보고도 있다. 그러나 이러한 함유매개체의 사용은 조직재생에 있어 조직형성을 지연, 방해할 수 있는 단점이 있는 것으로 여겨지고 있다. 즉 methylcellulose gel이나 교원질의 경우 첫째, 결손부에 삽입시 이러한 매개체가 세포의 이주, 증식과 결손부의 새로운 기질형성을 방해하여 치유를 지연시킬 수 있으며 둘째 함유매개체를 삽입시, 이를 항원(foreign body)으로 인식하여 염증세포의 출현으로 결손부에 염증반응이나 면역반응을 유발하며, 이는 함유매개체가 완전히 제거될 때까지 계속된다. 세번째로는 함유매개체의 유지기간이 짧은 경우 성장인자의 작용기간 또한 짧아진다. 예로써 methylcellulose gel을 사용한 경우 성장인자의 반감기가 3-4.2시간이며, 4일후에는 96%이상의 성장인자가 소실되며[17], porous polysulfone인 경우 PDGF-BB와 초기결합은 53%이며, 4일째는 단지 35%만 결합한다[52]. 또한 교원질과 TCP를 함유매개체로 사용한 조 등[40]의 연구에서도 이들 함유매개체가 있었던 부위는 비골성 결체조직으로 채워져, 함유매개체 그 자체가 세포 증식에 방해가 되는 것으로 여겨진다고 보고한 바 있다.

또 다른 성장인자 적용방법으로 탈회된 치근면의 이용이 있으며, 치근면 탈회는 치주조직 재생을 위해 치주과학 영역에서 오래전부터 연구되어져 왔다. 치근면 탈회의 효과로는 내독소 및 도말층 제거, 상아세관 및 교원질 노출, 상피세포의 하방증식억제, 섬유아세포의 증식촉진, 교원질분해효소의 활성억제 등이 보고되었으며, 탈회를 위해서는 구연산과 테트라사이클린이 주로 사용되고 있다. Terranova 등[30, 55, 56]은 여러 가지 생물학적 물질(biological macromolecules)이 탈회된 치근면과 결합가능하며, 성장인자 또한 노출된 치근면의 type-Ⅰ 교원질과 결합함을 보고하였고, Kelly 등[57]도 PDGF-BB가 세포외기질(extracellular matrix)과 결합가능함을 보고 하였다. 그리고 Cho 등[41]은 동물실험에서 3급이개부 병변에 구연산으로 치근면 처리후 성장인자와 조직유도재생술을 사용시 치주조직재

생의 촉진을 보고하였으며, 조 등[40] 또한 구연산 처리후 성장인자 도포가 교원질이나 TCP를 사용한 것보다 우수함을 보고하였다. 그러나 탈회된 치근면에 도포된 성장인자가 어느 정도 치주조직재생에 작용하는지에 대한 연구는 아직 미미하여 본 실험에서는 구연산과 테트라사이클린으로 탈회시킨 치근면에 도포된 PDGF-BB가 치은섬유아세포의 부착과 증식에 미치는 영향 및 탈회된 치근면에 도포된 PDGF-BB의 용출액을 이용하여 72시간동안 치은섬유아세포를 배양하여 성장인자의 유리기간을 측정해봄으로서 탈회된 치근면과 성장인자의 사용이 치주조직재생에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

본 실험에서 치근면 탈회 후 PDGF-BB 도포시 치은섬유아세포의 부착과 증식에 미치는 영향으로는 치근면 탈회 후 PDGF-BB를 적용한 군에서 치근면 탈회없이 PDGF-BB를 도포한 군보다 더 많은 부착양상을 보였으며, 또한 치은섬유아세포의 증식에 대한 효과 비교에서도 치근면 탈회후 PDGF-BB 적용군이 치근면 탈회없이 PDGF-BB를 적용한 군보다 많은 증식양상을 보였고, 시간경과에 따라 전반적으로 증식세포수가 증가하는 양상을 보였다. 각각의 경우 부착과 증식은 구연산 처리의 경우 부착에서는 1.5배, 증식에서는 1.4-2.3배, 테트라사이클린 처리시에는 부착은 2.6배, 증식은 2-6배 정도였다. 이는 시험관적 실험에서 Terranova 등의 테트라사이클린으로 처리된 치근면에 내피성장인자(endothelial cell growth factor)를 적용시 상아질과 결합하여 치근면 처치없이 내피성장인자를 적용한 경우보다 1-20ng 범위에서 치주인대세포의 이주가 증가하였다는 보고[55]와 치근절편을 구연산과 fibronectin으로 처치후, 10일 동안 5ng/ml PDGF를 적용 후 사람의 치주인대세포를 접종시, 2배 정도 치주인대세포의 주화성과 증식이 있었다는 보고[58] 및 테트라사이클린과 구연산 처치후 염기성 섬유아세포 성장인자 적용시 5-20ng 범위에서 농도 의존적으로 인간의 제대정맥내피세포(human umbilical vein endothelial cells)의 이주가 증가하였다는 보고[56]와 정도의 차이는 있으나 유사한 결과이며, 또한 생체 실험에서는 성견에서 인위적으로 야기한 3급 이개부병변에서 구연산 처치후 PDGF-BB와 조직유도재생술을 사용하여 3급 이개부병변의 치유를 보고한 Cho 등[41]의 결과와 그리고 역시 성견에서 구연산 처치후 PDGF-BB 처리군에 다른 군보다 우수한 치주조직재생을 보고한 조 등[40]과도 유사한 결과로 사료된다. 이러한 요인으로는 여러 가지 생물학적 물질이 탈회된 치근면과 결합가능하고, 성장인자 또한 노출된 치근면의 type-Ⅰ 교원질과 결합하며, 그리고 PDGF-BB도 세포외기질(extracellular matrix)과 결합에 의한 것으로 사료되며, 탈회후 PDGF-BB 적용군에서 세포의 부착과 증식이 더 많이 나타난 본 실험의 결과도 비탈회군보다 치근면 탈회군에서 PDGF-BB가 노출된 치근면의 교원질과 더욱 많이 결합하여 생긴 결과로 사료된다. 그리고 탈회된 치근면 자체가 세포의 부착과 증식에 유리한 환경을 제공할 수 있어, 이 또한 본 실험 결과의 한 요인으로 작용했을 것으로 사료된다. 구연산과 테트라사이클린 처리군에서의 세포 부착 및 증식 실험에서 접종 시보다 접종 6시간 후 관찰에서 더 많은 부착양상을 보였는데, 그 원인으로 치근면 탈회에 의한 효과인지 PDGF-BB에 의한 효과인지에 대해서는 본 실험에서 확인할 수 없었다.

탈회된 치근면에 도포된 PDGF-BB의 용출액을 이용하여 72시간동안 치은섬유아세포를 배양한 실험에서는 탈회시킨 후 PDGF-BB를 도포한 용출액에서 배양된 세포에서는 용출액의 시간 경과에 따라 증식이 감소하는 양상을 보이고, 대조군에서는 용출액의 시간에 관계없이 거의 일정한 양상을 보였다. 대조군-2와 비교시 탈회후 PDGF-BB를 도포한

실험군의 용출액에서 더 많은 세포증식을 보였으며, 통계학적으로 6일째 용출액까지 유의한 차이가 있어, 본 실험에서는 6일정도 PDGF-BB가 탈회된 치근면에서 유리된다고 예측할 수 있다. 이는 Cho 등[42]이 동물실험에서 구연산 처치후 상피성장인자를 적용후 조직검사한 결과, 8일까지 상당량의 성장인자가 잔존한다는 보고와 비교시 2일 정도 짧은 것으로, 이는 실험 방법 즉 생체실험과 시험관적 실험의 차이로 여겨진다. 생체에 특히 치주조직 결손부에 적용된 성장인자는 시간에 경과함에 따라 그 정도가 감소하나, 그 주위 조직에 흡수되어 서서히 감소하며, 본 실험에서는 용출액 채취시 성장인자가 유리된 용출액을 모두 제거하기 때문에 빠른 감소를 보였을 것으로 사료되어지며, 성장인자의 적용농도 및 종류 또한 상이한 결과의 한 원인으로 사료된다. 그러나 methylcellulose gel이나 porous polysulfone등 다른 함유매개체를 사용한 경우와 비교시 본 실험에 사용한 치근면 탈회가 더 오랫동안 PDGF-BB가 작용할 수 있게 한다고 사료되어진다.

또한 본 실험에서 대조군 상호간의 비교시, 치면에 6, 24, 48, 72시간 배양 실험에서는 6시간 세포배양에서만 유의한 차이를 보였고, 용출액을 이용한 실험에서도 1일째 용출액에서만 대조군-2가 대조군-1보다 유의한 차이를 보였으며, 그 이후 시간에서는 대조군 상호간에 유사한 결과를 보였다. 이는 비탈회된 치근면에 PDGF-BB 도포시 치근면과 PDGF-BB의 결합이 미미하거나, 생기지 않아 소량의 PDGF-BB가 작용하였거나, 혹은 빠른 소실을 야기하여 PDGF-BB의 작용기간이 짧아졌어 생긴 결과로 사료되어지며, 이는 치근면 탈회 후 PDGF-BB를 도포시 PDGF-BB가 치근면과 결합하여 더 오랫동안 작용할 수 있게한다는 것을 간접적으로 보여준다고 사료된다.

탈회된 치근면에 성장인자의 결합정도는 Terranova등에 의하면 치근면 탈회시 탈회하지 않은 치근면에 비해 섬유성장인자의 경우 2.5배[56], 내피세포성장인자의 경우 3배[55]라고 보고하였고, 이러한 성장인자 적용부위로서 탈회된 치근면의 작용은 Cho 등[41, 42]에 의하면 첫째, 세포 이주를 위한 유리한 환경제공뿐만 아니라, 새로 형성된 교원질과 노출된 치근면의 교원질과의 결합을 촉진시켜 빠른 신부착을 야기하며, 둘째 성장인자의 세포에 대한 이주, 증식을 촉진하며, 이는 세포의 빠른 재군락화 및 신생치주인대 형성에 기여한다. 셋째, 성장인자가 노출된 치근면의 기질과 결합하여 초기 치유기간 동안 일정하게 유리되며, 넷째로는 탈회된 치근면에 적용된 성장인자는 세포의 이주나 증식을 방해하거나 다른 염증반응을 유발하지 않는다고하여 치주조직 재생을 위해 성장인자 적용시 치근면을 탈회시키는 것이 유리할 것으로 사료된다.

본 연구에서 시행한 두 가지 실험 모두에서 테트라사이클린과 구연산 탈회물질 상호간의 비교시, 테트라사이클린 처치후 PDGF-BB를 도포한 군에서 더 우수한 결과를 보였으며, 이는 Terranova 등[30]이 테트라사이클린으로 처리시 구연산보다 3배 더 많은 섬유아세포의 부착을 보이며, 박 등[59]은 테트라사이클린 처리시 구연산처리시보다 더 많은 치주인대 세포의 증식을 보였다는 보고와 유사하며, 또한 Baker 등[60]이 보고한 테트라사이클린이 치근면에 강하게 흡착되어 활성형으로 유리된다는 것과 연관이 있을 것으로 사료된다. 그리고 또 다른 이유로는 성장인자가 탈회된 치근면과 결합때 교원질분해 효소가 존재시 결합정도가 떨어진다고한 Terranova 등[56]의 보고를 고려할 때, 테트라사이클린이 교원질분해효소의 활성도를 저하시키는 효과도 있어[26] 테트라사이클린으로 치근면 처리시 더 많은 PDGF-BB가 치근면과 결합할 수 있을 것으로 생각되며 결과적으로 구연산으로 치근면 처리시보다 세포의 부착과 증식을 증가

시킬 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과로써, 치근면 탈회 후 PDGF-BB 적용시 PDGF-BB가 노출된 치근면의 교원질과 결합하여 세포의 부착과 증식 증가, 성장인자의 작용 기간을 증가시키며, 그리고 탈회된 치근면 자체의 세포 이주, 부착과 증식 촉진 및 교원질 결합 증진 효과 등과 작용하여 치주조직재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료되며, 향후 치근면 탈회후 성장인자의 결합정도와 탈회면에서 유리되는 성장인자의 정량적 분석, 유리정도와 양상 및 성장인자의 적정 유지시간, 다른 성장인자와 탈회된 치근면과의 관계 등에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

VII. 요 약

치주조직 재생에 중요한 역할을 미치는 성장인자의 여러 가지 적용방법 중 탈회된 치근면에 성장인자를 도포시 성장인자 함유매개체로서 탈회된 치근면의 효과와 성자인자의 유리기간을 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

교정치료를 목적으로 내원한 환자의 소구치 부위의 정상 치은을 절제하여 치은섬유아세포를 분리, 배양하였고, 중정도의 치주질환에 이환되어 발치된 치아를 철저히 치근활택술을 시행후 시편을 제작하였다. 치근면 처치를 하지 않은 시편을 대조군으로, 구연산과 테트라사이클린으로 탈회시킨 시편을 실험군으로 하여 각 군을 100ng/ml PDGF-BB에 5분간 침수시킨 후 각 시편에 치은섬유아세포를 접종후 6시간, 24시간, 48시간, 72시간 배양하여 각 절편의 단위면적당 부착세포수와 증식세포수를 측정하였다. 또한 탈회된 치근면에서 성장인자의 유리기간을 측정하기 위한 용출액을 이용한 세포배양은 위의 방법으로 시편 제작후 치근면 처치를 하지않고 배양액에 5분간 침수시킨 군과 200ng/ml PDGF-BB에 침수시킨 군을 대조군으로, 테트라사이클린과 구연산으로 치근면 처치 후 200ng/ml PDGF-BB에 5분간 침수시킨 군을 실험군으로 하였다. 침수 후 각 시편을 다시 1ml 배양액에 넣고, 1일, 2일, 4일, 6일, 8일째 배양액을 채취하여, 72시간 배양후 증식 세포수를 측정하여 다음의 결과를 얻었다.

세포의 부착, 증식에 관한 실험에서 부착, 증식 모두에서 치근면 탈회후 PDGF-BB 적용군이 치근면 탈회없이 적용시보다 많은 부착과 증식을 보였으며, 모든 군에서 통계학적으로 유의한 차이($P<0.01$)를 보였고, 구연산과 테트라사이클린 상호간 비교에서는 부착과 증식 모두에서 테트라사이클린 처리군이 더 많은 부착과 증식을 보였으며, 통계학적으로 유의한 차이($P<0.01$, 0.05)를 보였다. 용출액을 이용한 성장인자 유리기간 측정에서도 탈회 후 PDGF-BB를 도포한 군의 용출액에서 더 많은 세포증식을 보였고, 통계학적으로 6일째 용출액까지 유의한 차이($P<0.01$, 0.05)를 보였으며, 이의 결과로 미루어 탈회된 치근면에 도포된 PDGF-BB의 유리기간은 6일 정도로 생각되며, 역시 탈회 물질 상호간의 비교에서 테트라사이클린으로 치근면 탈회후 PDGF-BB를 도포한 군이 구연산 처리후 PDGF-BB를 도포한 군보다 우수한 효과를 보였다.

참고문헌

1. Melcher, H.H. : On the repair potential of periodontal tissue, J. Periodontol., 47 : 256-260, 1976
2. Stahh, S.S. : Repair potential of the soft tissue root interface, J. Periodontol., 48 : 545-552, 1977
3. Polson, A.M. : The root surface and regeneration : Present therapeutic limitations and future biologic potentials,

J. Clin. Periodont., 13 : 995-996, 1986
4. Nyman, S., Karing, T., Lindhe, J. and Platen, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue, J. Clin. Periodont, 7 : 394-401, 1980
5. Karring, T., Nymann, S., Lindhe, J. and Sirirat, M. : Potentials for root resorption during periodontal wound healing, J. Clin. Periodont., 11 : 41-52,1984
6. Karring, T., Nymann, S., Lindhe, J. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into bone tissue, J. Clin. Periodont., 7 : 96-105, 1980
7. Andreasen, J.O. : Periodontal healing after replantation and autotransplantation of permanent incisors, Int. J. Oral Surg., 60 : 54-61, 1981
8. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe. J. : The regenerative potential of the periodontal ligament, : An experimental study in the monkey, J. Clin. Periodont., 9 : 257-265, 1982
9. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, J. Clin. Periodont., 9 : 290-296, 1982
10. Renvert, S. and Egelberg, J. : Healing after treatment of periodontal intraosseous defects Ⅱ. Effect of citric acid conditioning of the root surface, J. Clin. Periodont., 8 : 459-473, 1981
11. Wikesj , U.M.E., Claffey, N., Nilveus, R. E. and Egelberg, J. : Periodontal repair in dogs. : Effect of root surface treatment with staneous fluoride or citric acid on root resorption, J. Periodontol., 62 : 180-184, 1991
12. Martin M., Gantes B., Garrett S. and Egelberg J. : Treatment of periodontal furcation defects. I. Review of literature and description of a regenerative surgical technique, J. Clin. Periodontol., 15 : 227-231, 1988.
13. Gantes B., Martin M., Garrett S. and Egelberg J. : Treatment of periodontal furcation defects. II. Bone regeneration in mandibular class II defects, J. Clin. Periodontol., 15 : 232-239, 1988.
14. Greenstein G. and Caton J.G. : Biodegradable barriers and guided tissue regeneration, Periodontology 2000, 1 : 36-45, 1993.
15. Karring T., Nyman S., Gottlow J. and Laurell L. : Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies, Periodontology 2000, 1 : 26-35, 1993.
16. Lynch S.E., Williams R.C., Polson A. M., Howell T. H., Zappa U. E. and Antoniades H.N. : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration, J. Clin. Periodontol., 16 : 545-548, 1989.
17. Lynch S.E., Castilla G.R., William R.C., Kiritsy C. P., Howell T.H., Reddy, M.S. and Antoniades, H.N. : The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing, J. Periodontol., 62 : 458-467, 1991.
18. Lynch S.E., Buser D., Hernandez R.A., Weber H.P., Stich H., Fax H. and William R.C. : Effects of the platelet-derived growth factor/Insulin-like

growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants : Results of a pilot study in beagle dogs, J. Periodontol., 62 : 710-716, 1991.

19. Boyko, G.A., Brunette, D.M. and Melcher, A.H. : Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro, J. Periodont. Res., 15 : 297-303, 1980
20. Pitrau, S. and Melcher, A.H. : Organization of and oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblasts attached to dental tissue : relationship between cells and mineralized and demineralized tissue, J. Periodont. Res., 22 : 6-13, 1987
21. Fine, D.H., Morris, M.L., Tabara, L. and Cole, J.D. : Preliminary characterization of material eluted from the roots of periodontally diseased teeth, J. Periodont. Res., 15 : 10-19, 1980
22. Polson, A.M., Frederick, G.T., Ladenheim, S. and Hanes, P.J. : The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid, J. Periodontol., 55 : 443-466, 1984
23. Garret, J.S., Cigger, M. and Egelberg, J. : Effect of citric acid on diseased root surfaces, J. Periodont. Res., 13 : 155-163, 1978
24. Wikesj , U.M.E. : Periodontal repair in dogs, Effects of heparin treatment in the root surface, J. Clin. Periodontol., 18 : 60, 1991
25. Pettresson, E.C. and Aukhil, J. : Citric acid conditioning of roots affects guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds, J. Periodont. Res., 21 : 543-552, 1986
26. Golub, L.M., Cianocio, S., Ramamuthy, N.S. and McNamara, T.F. : Low-dose doxycycline therapy : Effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans, J. Periodont. Res., 25 : 321-330, 1990
27. Al-Ali, W., Bissada, N.F. and Greenwell, H. : The effect of local doxycycline with and without tricalciumphosphate on the regenerative healing potential of periodontal osseous defects in dogs, J. Periodontol., 60 : 582-590, 1989
28. Pepelassi, E.M., Bissada, N.F., Greenwell, H. and Farah, C.F. : Doxycycline-tricalcium phosphate composite graft facilitates osseous healing in advanced periodontal furcation defects, J. Periodontol., 62 : 106-115, 1991
29. Caffesse, R.G., Smith, B.A., Nasileti, C.E. and Lopatin, D.E. : Cell proliferation after flap surgery, root conditioning and fibronectin application, J. Periontol., 58 : 661-666, 1987
30. Terranova, V.P., Franzetti, L.L., Diflorio, R.M., Lyall, R.M, Wikesj , U.M.E. : A biomechanical approach to periodontal regeneration : tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth, J. Periodont., Res., 21 : 330-337, 1986
31. Wikesj, U.M.E., Baker, P.I., Christersson, L.A., Genco, R.I. : A biomechanical approach to periodontal regeneration : Tetracycline treatment conditions dentin surfaces, J. Periodont. Res., 21 : 322-329, 1986
32. Terranova, V.P. and Wikesj , U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide

growth factors as mediators of functions of cell of periodontium, J. Periodontol., 58 : 371-380, 1987.
33. Rappolee, D.A., Mark, D. and Banda, M. J. : Wound macrophages express TGF-α and other growth factors in vivo : Analysis of mRNA phenotyping, Science, 241 : 707-712, 1988.
34. Antoniades, H.N., Galanopoulas, T. and Neville-Golden, T. : Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor(PDGF) and PDGF receptor in RNA's in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts, Proc. Natl. Aca. Sci. USA., 88 : 565-569, 1991.
35. Sitarus, N.M., Sariban, E. and Pantagis, P. : Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen, J. Cell Physiol., 132 : 376-380, 1987.
36. Hauschka, P.C., Mavrakos, A.E., Iafrati, M.D., Doleman, S.E. and Klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix, J. Biol. Chem., 261 : 12665-12674, 1986.
37. Matsuda, N., Lin, W.L., Cho, M.I., Genco, R.J. : Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of root periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factor in vitro, J. Periodontol., 63 : 515-525, 1992
38. Oates, T.W., Rouse, C.A. and Cochran, D.L. : Mitogenic effects of growth factors human periodontal ligament cells in vitro, J. Periodontol., 64 : 142-148, 1993
39. Rutherford, R.B., Ryon, M.E., Kennedy, J.E., Tucker, M.M., Charette, M.F. : Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys, J. Clin. Periodont., 20 : 537-544, 1993.
40. 조무현, 박준봉 : 혈소판유래성장인자-BB가 성견 치주이개부병변의 조직재생에 미치는 효과, 대한치주과학회지, 23 : 535-563, 1993.
41. Cho. M.I., Park, J.B., Genco, R.I. : Periodontal regeneration in class Ⅱ furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor, J. Periodontol., 66 : 462-477, 1995.
42. Cho, M.I., Lin, W.L., Genco, R.J. : Platelet Derived Growth Factor-Modulated Guided Tissue Regenerative Therapy, J. Periodontol., 66 : 522-530, 1995.
43. Coldiron, N.B., Yukna, R.A., Caudill, R.F. : A Quantitative study of cementum removal with hand curettes., J. Periodontol., 61 : 293-299, 1990.
44. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L. : A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro, Pro. Nat. Acad. Sci., 71 : 1207-1210, 1974
45. Kohler, N. and Lipton, A. : Platelets as a source of fibroblast growth promoting activity, Exp. Cell. Res., 87 : 297-301, 1974.
46. Antoniades, H.N., Scher, C.D. and Stiles, C.D. : Purification of human platelet derived growth factor, Meth. in Enzym, 109 : 749-773, 1985.

47. Rutherford, R.B., TrilSmith, M.D., Ryan, M.E. and Charette, M.F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet derived growth factor mitogenesis in vitro, Arch. Oral. Biol., 37 : 139-145, 1992.
48. Piche, J.E., Carnes Jr.D.L., Graves, D.T. : Initial characterization of cells derived from human periodontia, J. Dent. Res., 68 : 761, 1989.
49. Lowenberg, B.F., pilliar, R.M., Aubin, J. E., Sodeck, T., Melcher, A.H. : Cell attachments of human gingival fibroblasts in vitro to porous-surfaced titanium alloy discs coated with collagen and PDGF., Biomaterials, 9 : 302-309, 1988.
50. Ross, R., Greenhalgh, D.G., Sprugel, K. H., Murry, M.J. : PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse, Am. J. Patho., 6 : 1235-1246, 1990
51. Tornes, K., Busch, D., Solheim, E., Bary, G. : Guided tissue regeneration and local delivery of insuline-like growth factor I by bioerodible polyorthoester membranes in rat calvarial defects, Int. J. Oral. Max. Impt., 11 : 498-505, 1996
52. Mailhot, J.M., Sharawy, M.M., Galal, M., Oldham, A.M., Russell, C.M. : Porous polysulfone coated with PDGF-BB stimulates proliferation of human gingival fibloblasts., J. Periodontol, 67 : 981-985, 1996.
53. 김용태, 한주석, 유형근, 신형식 : Fibronectin과 성장인자의 단독 혹은 복합 투여가 배양 인체치은섬유아세포 및 치주인대세포의 활성에 미치는 효과, 대한치주과학회지, 25 : 239-252, 1995.
54. 정성민, 이만섭, 박준봉 : 탈회동결건조골에 혼합한 형질변형 성장인자(TGF-β 1)가 골조직 재생에 미치는 효과, 대한치주과학회지, 25 : 357-371, 1995.
55. Terranova, V.P., Hic, S., Franzetti, L., Wikexsj , U.M.E. : A biomechanical approach to periodontal regeneration, AFSCM : Assays for specific cell migration, J. Periodontol., 58 : 247, 1987.
56. Terranova, V.P., Tweden, K.S., Sapadone, D.P. : Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligment cells and endothelial cells, J. Periodontol., 6 : 293-301, 1989.
57. Kelly, J.L., Sanchez, A., Brown, G.S., Chestman, C.N., Sleigh, M.J. : Accumulation of PDGF-B and cell binding forms of PDGF-A in the extracelluar matrix., J. Cell. Biol., 121 : 1153-1163, 1993.
58. Terranova, V.P. : Extracellular matrix molecules modulate the phenotype of the resident cells ; mechanism of periodontal ligament cell and endothelial cell adherence to dentin. The biologic mechanisms of tooth eruption and root resorption. An International Conference, Edited by Zeev Debidobitch : 23-34, 1988.
59. 박재완, 서조영 : 테트라사이클린과 구연산을 처리한 치근면에서 치주인 대세포의 증식과 전개에 관한 비교 : 대한치주학회지, 25 : 587-602, 1995.
60. Baker, P.J., Evans, R.T., Coburn, R.A. and Genco, R.J. : Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form, J. Periodontol., 54 : 580-585, 1983.

-Abstract-

The Effect of decalcified Root Surface as PDGF Carrier*

Sang-Hyo Woo, Jae-Mok Lee, Jo-Young Suh
Department of periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University
Taegu, Korea

It is known that growth factors function as potent biologic mediators regulating numerous activities of wound healing via cell proliferation, migration and extracellular matrix formation and they also promote periodontal regeneration. But, method of growth factor application is controversial yet. So purpose of this study is to evaluate the effect of demineralized root surface as one of method of growth factor application.

The ginigival fibroblasts were primary cultured and fifth or sixth subpassages were used in these experiments. In first experiment, root surface blocks demineralized with 100mg/ml tetracycline for 5 minutes and pH 1 citric acid for 3 minutes(experimental groups) and non-demineriliized root surface blocks (control groups) were placed in 100ng/ml PDGF-BB for 5 minutes.

Then the cells were seeded on each root surface blocks and cultured for 6, 24, 48, 72 hours. In second experiment, root surface blocks demineriliized with tetracycline and citric acid and non-demineralized root surface blocks were placed in 200ng/ml PDGF-BB for 5 minutes and another non-demineralized root surfcae blocks were placed in DMEM without PDGF-BB. At 1, 2, 4, 6, 8 days, the cells were seeded in 24-well plate and using of each eluent, cultured for 72 hours. The results of the four determinants were presented as mean and S.D..

The results were as follows :

The attachment and proliferation of human gingival fibroblast on root surface were more increased when PDGF-BB was applicated on root surfrace demineralized with tetracycline or citric acid than non-demineralized root surface. And, in comparision tetracycline with citric acid, there were more attachment and proliferation of human gingival fibroblast on root surface demineralized with tetracycline than citric acid, and proliferation of human gingival fibroblast on demineralized root surface was increased time dependently 1 day to 3 days.

In second experiment using eluent, proliferation of human gingival fibroblast was more increased to 6 days when human gingival fibroblast was cultured in eluent that PDGF-BB was applicated on demineralized root surface than two control groups, and degree of proliferation was decreased time dependently 1 day to 6 days. Proliferation of human gingival fibroblast cultured in eluent without PDGF-BB was constant 1 day to 6 days. After 6 days, degree of proliferation of human gingival fibroblast was similar in four groups. This means that release duration of PDGF-BB from demineralized root surface is 6 days. And in comparision tetracycline with citric acid, there was more proliferation of human gingival fibroblast in tetracycline-treated group than citric acid.

In conclusion, demineralized root surface as primary site for PDGF-BB application, especially demineralized with tetracycline has important roles in attachment and proliferation of human gingival fibroblast, and may be useful clinical applications in periodontal regenerative procedures.