

# 혈소판유래성장인자-BB가 골간질세포와 치주인대세포의 성상에 미치는 연구

권영혁 · 박준봉

경희대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

치조골 재생과정에 관여하는 기원세포는 치주인대조직내에 다양한 조직으로 분화가능한 복합기능 세포(Multipotential cell)가 존재할 수도 있고, 치조골로 분화가능한 특정세포가 존재할 수가 있다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. Melcher(1976)<sup>1)</sup> 또한 특정한 환경하에서 치주인대내의 혈관주위세포가 치조골쪽으로 이주하여 골아세포로 분화되어 신생골을 형성한다는 보고와 함께 이들 세포들의 성격규명에 대한 연구들이 활발하게 되었다. Robert 와 Chase(1981)<sup>2)</sup>

세포생물학의 연구방법의 발전에 따라 각종 세포의 고유성상이 규명되어 세포의 화학주성이 밝혀지기 시작하였고, 조직치유과정에서 신속한 세포증식과 일정방향으로의 이동이 가장 중요한 조직반응이라는 점이 제시되었으며, 이러한 세포의 증식, 이주, 기질합성등을 조절하는 인자중의 하나로 폴리펩타이드계 성장인자(Polypeptide Growth Factor, PGF)의 중요성이 대두되었다. Terranova (1990)<sup>3)</sup>

PGF는 임상분야에서 손상조직의 회복이나

재생에 기시역할을 하는 세포증식 조절인자로 관여 하기 때문에 조직재생 연구분야에서 관심의 대상이 되어왔으며, 치주과학 영역에서도 이상적 치유형태를 구현할 수 있는 조직재생방법으로 PGF의 이용 가능성에 대해 Terranova와 Wikesjö(1987)<sup>4)</sup> 및 Lynch등(1987, 1989)<sup>5), 6)</sup>이 보고한 바 있다.

PGF중 창상치유에 관여하는 성장인자로서 Platelet-Derived Growth Factor(혈소판유래성장인자, PDGF), Fibloblast Growth Factor(FGF), Transforming Growth Factor- $\alpha$ , - $\beta$  (TGF- $\alpha$ , - $\beta$ ), Insulin-like Growth Factor(IGFs), Epidermal Growth Factor(EGF), Interleukin-1(IL-1) 등이 국소부위에서 증배엽세포를 조절하는데 중요하다고 알려져 있으며<sup>3)</sup> 이중 PDGF 가 조직재생에 가장 큰 영향이 있는 것으로 나타났다.

혈소판으로부터 동맥 평활근세포의 증식을 자극하는 PDGF는 Ross 등(1974)<sup>7)</sup>과 Kohler 와 Lipton(1974)<sup>8)</sup>에 의해 각각 발견되었고, Antoniades등(1979)<sup>9)</sup>에 의해 PDGF 분리법이 개발 명명되었다.

이러한 PDGF 를 유리하는 세포는 혈소판

\*이 논문은 1994년도 교황의학학술연구비에 의하여 작성되었음.

이외에 단핵세포 및 대식세포, Megakaryocyte, 내피세포 외에도 다수의 세포들이 있는 것으로 Ross와 Vogel(1978)<sup>10)</sup> 및 Ross와 Raines(1986)<sup>11)</sup> 밝혀졌다. 그 이후 Canalis 등(1989)<sup>12)</sup> 과 Deuel 등(1981)<sup>13)</sup>에 의해 PDGF의 효과에 대한 시험관적 연구는 물론 연조직 치유에 미치는 영향 Greenhalgh 등(1990)<sup>14)</sup>, Schwartz 등(1990)<sup>15)</sup>, Sprugel 등(1987)<sup>16)</sup>, (1991)<sup>17)</sup>과 경조직 형성에 미치는 영향 Lynch(1987)<sup>18)</sup>, (1989)<sup>19)</sup> 등 조직 치유과정에 미치는 영향에 대한 연구가 활발하게 진행되었다.

또한 시험관적 실험을 통하여 Piché와 Graves(1989)<sup>40)</sup>는 골유래세포 배양시 PDGF를 첨가한 경우 세포의 증식율이 촉진되었다고 보고하였고, Rutherford 등(1992)<sup>21)</sup>은 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF의 효과를 규명한 실험에서 각 세포의 증식에 유효하다고 보고하였다.

또한 생체실험에서 Lynch 등(1987, 1989)<sup>5)</sup>은 PDGF나 IGF-I를 단독으로 치주결손부에 적용하였을 때 신생 치조골과 신생 백악질의 형성을 자극할 수 있고 IGF-I와 혼용시 상승효과가 있다고 보고하였으며, Lynch 등(1989)<sup>6)</sup>은 PDGF를 치아매식체에 응용하여 주입해 본 결과 매식체 주위로 치조골이 형성됨을 보고하였다.

그러나 치주조직의 재생과정에는 구성요소가 치은, 치주인대, 백악질 및 치조골로 이루어져 있으므로 치주인대세포의 분화증식도 중요하나 궁극적인 재생은 역시 지지 골조직의 재생을 배재할 수가 없다. 또한 병적으로 파괴된 골조직의 재생은 치주인대세포가 증식되어 조골세포로 분화한다는 부분도 있으나 손상부 골표면으로부터의 증식도 중요하다. 따라서 신생골 형성의 주체가 되는 골세포와 다양한 조직으로 분화가 가능한 치주인대세포의 세포성격을 동시에 비교하고 성장인자에 대해 변화되는 영향을 규명하는 것이 조직재생과정을 이해하는데 효과적이라 생각된다.

본 연구는 기존 조직의 재생능력을 활성화하는 것으로 알려진 Platelet-Derived Growth Factor-BB를 치주조직의 구성요소중 가장 중요한 역할을 하는 치주인대세포와 골세포에 작용시켜 골조직형성에 미치는 영향을 생물학적 표식자를 이용하여 그 영향을 상호비교 분석하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구대상 및 시약

#### (1) 연구대상

연구대상으로는 생후 4주이며 평균체중 100g 정도의 웅성 백서 10수로부터 배양한 치주인대세포와 골간질세포를 대상으로 실험을 하였다.

#### (2) 재료 및 시약

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 DMEM으로 표기)을 사용했고, fetal bovine serum (Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장촉진제로 추가하였으며, 그 외 trypsin, dimethyl sulfoxide (이하 DMSO로 표기), (Sigma사, 미국) 등을 사용하였고, 기타 시약들은 시판되는 일급 시약들을 사용했다. 본 실험에 사용되는 혈소판유래 성장인자는 Platelet Derived Growth Factor-BB형(이하 PDGF-BB로 표기, Genzyme, 미국)을 이용하였다.

### 2. 방법

#### (1) 세포 배양

##### ① 치주인대세포 배양

0.4%  $\beta$ -Aminopropionitrile(Sigma chemical Co., U.S.A.)을 희석전 5일동안 투여한 웅성 백서에 30mg/kg의 Pentobarbital Sodium (Tokyo chemical industry Co., Japan)을 복강 주사하여 전신마취시킨 후 Adison's Tissue

forcep 을 이용 상악 제 1대구치를 발거하였다. 발거된 치아의 원심치근으로 부터 잔존 조직을 절취하여 직경 35mm의 배양접시에 균등분포한 후 20% Fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.)과 100 unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 0.5 $\mu$ g/ml amphotericin-B (Gibco, U.S.A.)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, U.S.A)을 초기배양액으로 하여 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합 세포배양기(Vision Scientific Co., Korea)에서 세포를 배양하였다.

치주인대세포가 조직절편으로부터 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층이 형성되면 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 처리하여 세포를 박리하고 1:3으로 분리 계대배양 하여 Rat Periodontal ligament cell(PDL)이라 명명하고 본 실험에 사용하였다. 20% FBS를 함유한 배양액을 초기배양액으로하고 10%의 FBS를 함유한 배양액을 표준배양액으로하여 본 연구에 사용하였다.

## ② 골간질세포 배양

치주인대세포의 배양시 이용된 백서의 후대 퇴부를 70% Ethyl alcohol로 소독절개한 다음 표피를 제거한 후 골막을 포함한 연조직을 완전히 제거한 후 순수골을 절취하여 양단을 외과용 가위로 절단하였다. 준비된 초기배양액으로 20 gauge Needle을 장착한 주사기를 이용 물리적 힘을 가하여 세포부유액을 만들고 부유물과 함께 추출된 배양액을 원심분리하여 직경 35mm 배양접시에 균등접종하여 상기와 동일한 방법으로 세포배양기에서 배양한다. 이때 배양된 세포를 Rat Bone Stromal cell(RBS)로 명명하였다.

## ③ 세포의 유지

각각의 세포를 밀생상태에 도달하면 1:3으로 계대배양하고 일부는 5% DMSO가 함유된 배양액에 분산하여 냉동후 액체질소 탱크

내에 보관하였으며 실험에 사용된 모든 배양액에는 10% FBS를 삽입하였다.

## (2) 세포증식속도 측정

24 well(Corning사, 미국)에 각 well당 1×10<sup>4</sup>세포를 접종하고, 실험군에는 PDGF-BB를 DMEM 1ml 당 10ng을 산정하여 주입하고, 대조군에는 PDGF-BB가 함유되지 않은 표준 DMEM 을 배양액으로 하여 1, 3, 6, 9, 13일 동안 배양한 다음 배양액을 버리고 Phosphate Bufered Saline(이하 PBS로 표기)으로 세척하고 0.05% trypsin/0.02% EDTA로 처리한 후 세포를 배양접시로 부터 완전히 분리 수거하여 Trypan blue로 염색하고 도립현미경(Olympus사, 일본) 상에서 Hemocytometer 상에서 세포수를 측정하였다.

## (3) Alkaline phosphatase 활성도 측정

초기 밀생상태의 RBS와 PDL을 trypsin처리하여 그 수를 측정한 후 24 well tissue culture plates (Corning사, 미국)에 각 well당 1×10<sup>5</sup>개 세포를 접종하고 대조군에는 PDGF-BB가 함유되지 않은 상태에서 접종하였으며, 실험군에는 DMEM 1ml 당 1mg의 PDGF-BB를 섞어 접종하고 10% FBS가 함유된 DMEM에서 3, 5일간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음 세포층에 lysis완충액 (0.02% Nonident F-40)을 500 $\mu$  첨가하여 30초간 초음파 분쇄기 (Ultrasonic Dismembrator Model-300, Fisher사, 미국)로 분쇄한 다음 50 $\mu$ 를 취하여 Kind King modified 방법에 의해 Alkaline phosphatase활성도를 측정하였다. 표준용액으로는 phenol (1mg/ml)을 사용하였고 500nm에서 Spectrophotometer(Shimatsu사, 일본)로 흡광도를 측정하여 국제단위(IU)로 Alkaline phosphatase의 활성치를 나타내었다.

## (4) 단백질 합성능 측정

초기 밀생상태의 RBS와 PDL을 0.05%

trypsin/0.02% EDTA으로 5분간 처리하여 그 수를 측정 한 후 24 well tissue culture plates (Corning 사, 미국)에 각 well당  $1 \times 10^5$ 개 세포를 접종하였다. 대조군에는 PDGF-BB가 함유되지 않은 상태에서 접종하였으며, 실험군에는 DMEM 1ml 당 PDGF-BB 10ng을 혼합 접종하고 DMEM에서 3, 5일간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음 세포층에 lysis완충액(0.02% Nonident F-40)을 500  $\mu$ l 첨가하여 30초간 초음파 분쇄기(Ultrasonic Dismembrator Model-300, Fisher 사, 미국)로 분쇄한 다음 100 $\mu$ l를 취하여 단백질 양을 Lowry법에 의해 측정하였다.

#### (5) 석회화 결절형성 관찰

초기 밀생 상태의 RBS와 PDL cell을 trypsin처리하여 그 수를 측정 한 후 35mm dish에 각각  $1 \times 10^5$ cells/ml의 세포를 2ml 접종하고 대조군에는 vehicle을 접종하고 실험군에는 PDGF-BB 10ng/ml의 최종농도가 되도록

주입하고 3일 간격으로 배지를 갈아주면서 PDGF-BB처치를 새로 한다. 배양 7일에 세포를 10% natural formalin solution에 30분간 고정 한 후 PBS로 세척하여 2% Alizalin red S 용액에 30분간 염색하고 다시 PBS로 세척후 2% Light green SF yellow stain으로 수초간 대조 염색을 한다. 도립 현미경 관찰 후 배양 접시 바닥에  $1.5 \times 1.5$ cm<sup>2</sup>의 격자구조의 투명 판을 이용하여 염색된 결절 수를 측정하였다.

### III. 연구결과

#### 1. 세포증식율

혈소판유래성장인자(PDGF)가 골간질 세포 증식율에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 골간질 세포를 1, 3, 6, 13, 15일간 배양한 결과를 Table 1과 Fig 1에 나타내었다. PDGF를 처리한 실험군과 처리하지 않은 실험군 사이의 증식정도는 배양한 지 13일째에 가장 현격

Table 1. The effect of Platelet-derived growth factor (PDGF) on the proliferation of rat bone stromal cell.

Group	Number of cells ( $\times 10^4$ cells/ml)					
	1day	3days	6days	9days	13days	15days
CONT	10.73 $\pm$ 0.78	21.34 $\pm$ 0.69	25.75 $\pm$ 0.84	28.53 $\pm$ 0.81	37.46 $\pm$ 2.36	52.33 $\pm$ 0.37
PDGF	13.46 $\pm$ 0.78	25.71 $\pm$ 1.11	30.97 $\pm$ 0.35	37.05 $\pm$ 0.39	61.35 $\pm$ 1.56	73.34 $\pm$ 1.43

Values are mean $\pm$ S.E., n=3.

CONT : Control group

PDGF : Platelet-derived growth factor-BB

Table 2. The effect of Platelet-derived growth factor(PDGF) on the proliferation of rat periodontal ligament cell.

Days in Culture	Number of cell ( $\times 10^4$ cells/ml)	
	CONT	PDGF
3	8.88 $\pm$ 0.072(100%)	11.13 $\pm$ 0.21(125.3%)
5	13.13 $\pm$ 0.15(100%)	20.39 $\pm$ 0.93(159.22%)

Values are mean $\pm$ S.E., n=3.

CONT : Control group

PDGF : Platelet-derived growth factor-BB

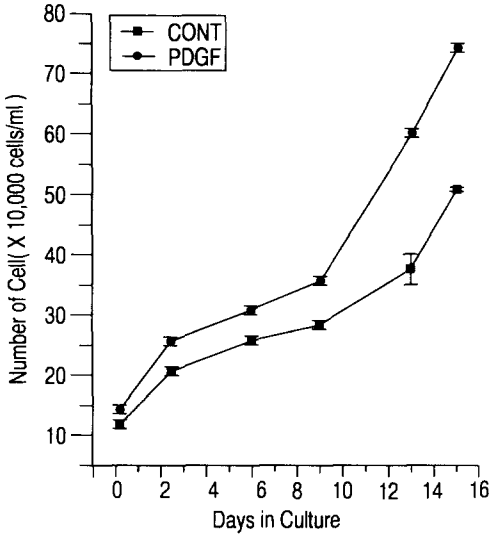


Fig 1. The effect of PDGF on the proliferation of rat calvaria cell

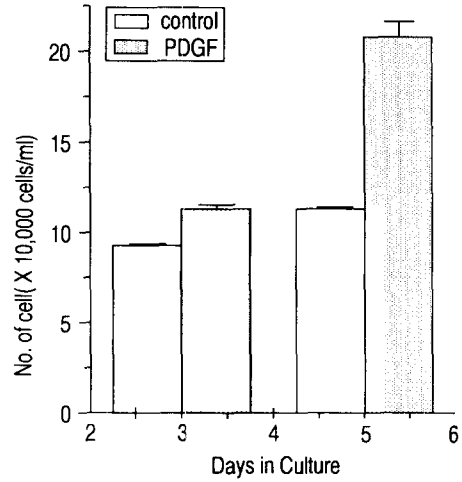


Fig 2. The effect of PDGF on the proliferation of rat periodontal ligament cell

한 차이를 보였다. 이러한 차이는 시일이 경과함에 따라 비례적인 경향을 나타내었다. 치주인대세포 증식에 대한 PDGF의 영향을 나타낸 Table 2와 Fig 2를 보면 PDGF를 처리하지 않은 대조군에 비해 3일째에는 20%, 5일째에는 59% 정도의 세포증식율을 보여 PDGF는 치주인대세포 증식에 유의적인 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

## 2. Alkaline phosphatase activity 측정

10ng/ml의 PDGF를 골간질 세포에 가했을

때 ALPase activity는 배양 3일째에는 대조군  $59.96 \pm 0.182$ 에 비해  $68.26 \pm 0.124$ 의 활성을 보여 대조군보다 14% 활성 증가를 보였다. 그러나 배양 5일째에는 대조군보다 급격한 활성 감소를 보였다(Table 3, Fig 3).

반면, 치주인대세포에서는 PDGF는 배양 3일째에 대조군의 20%의 ALPase activity(대조군  $32.18 \pm 0.036$ , 처치군  $40.04 \pm 0.096$ )를 증가시켰고 배양 5일째에는 대조군( $13.34 \pm 0.108$ )과 처치군( $15.67 \pm 0.07$ ) 모두 ALPase activity가 감소하였다 (Table 4, Fig 4).

또한 3일째의 골간질세포와 치주인대세포의

Table 3. The effect of PDGF on alkaline phosphatase activity in the rat bone stromal cell

Days in culture	ALPase activity(IU)	
	CONT	PDGF
3	$59.96 \pm 0.182$ (100%)	$68.26 \pm 0.124$ (113%)
5	$46.29 \pm 0.056$ (100%)	$13.23 \pm 0.058$ (28.58%)

Values are mean  $\pm$  S.E. , n=3

CONT : Control group

PDGF : Platelet-derived growth factor-BB

Table 4. The effect of PDGF on alkaline phosphatase activity in the rat periodontal ligament cell.

Days in Culture	ALPactivity(IU)	
	CONT	PDGF
3	32.18±0.036(100%)	40.04±0.09(124.4%)
5	13.34±0.108(100%)	15.67±0.07(117.5%)

Values are mean±S.E. , n=3.

CONT : Control group

PDGF : Platelet-derived growth factor-BB

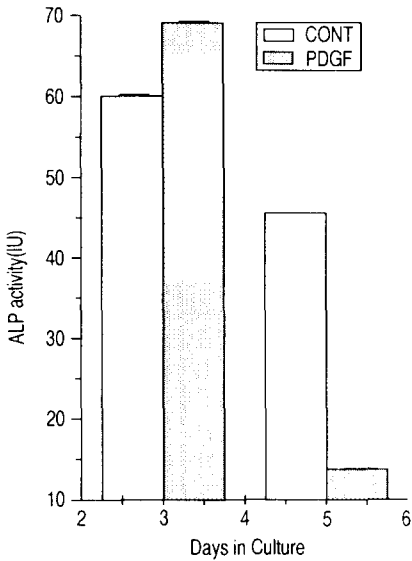


Fig 3. The effect of PDGF on alkaline phosphatase activity in the rat calvaria calvaria cell

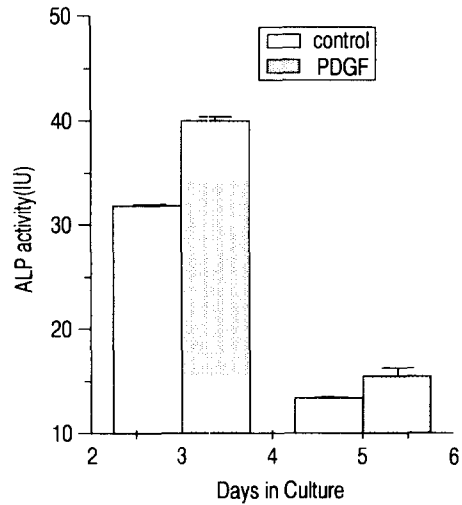


Fig 4. The effect of PDGF on alkaline phosphatase activity in the rat periodontal ligament cell

ALPase activity를 비교해 보면 치주인대세포보다 골간질세포의 ALPase activity가 대조군은 85%, 처치군은 70%가 높다. 이로써 골간질세포가 치주인대세포보다 골형성능력이 크고 PDGF는 골 형성을 촉진시킴을 알 수 있다.

### 3. 단백질 합성능 측정

골간질 세포의 단백질량은 배양 3일째에 대조군이 1.031±0.002mg/ml이고 처치군이 1.083±0.005mg/ml이었고 배양5일째에는 대조군이 1.039±0.0012로 증가하였고 처치군은 0.962±

0.0018로 감소하였다(Table. 5, Fig. 5).

반면에 치주인대세포의 단백질 함량은 배양 3일째에 대조군이 0.9366±0.0046, PDGF처치군이 1.0892±0.0024로 14%가량 증가하였고, 배양 5일째에는 대조군이 1.1225±0.0014, PDGF처치군이 1.2347±0.0062로 9%가 증가하여 골간질 세포에서와는 다른 양상을 보이고 있다(Table 6, Fig 6).

### 4. 석회화 결절 형성의 관찰

도립 현미경하에서 각 군의 결절 형성과정

**Table 5. The determination of protein in rat bone stromal cell treated with PDGF**

Days in Culture	Protein(mg/ml)	
	CONT	PDGF
3	1.031±0.002(100%)	1.083±0.005(105.0%)
5	1.039±0.0012(100%)	0.962±0.0018(92.6%)

Values are mean±S.E. , n=3.

CONT : Control group

PDGF : Platelet-derived growth factor-BB

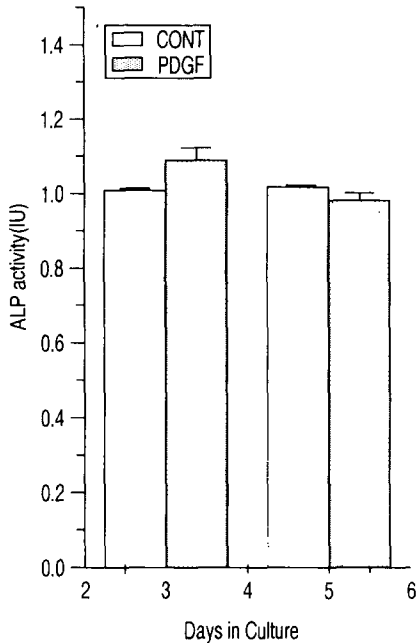
**Table 6. The determination of protein in rat periodontal ligament cell treated with PDGF**

Days in Culture	Protein(mg/ml)	
	cont	PDGF
3	0.936±0.0046(100%)	1.089±0.0024(116.3%)
5	1.123±0.0014(100%)	1.235±0.0062(109.9%)

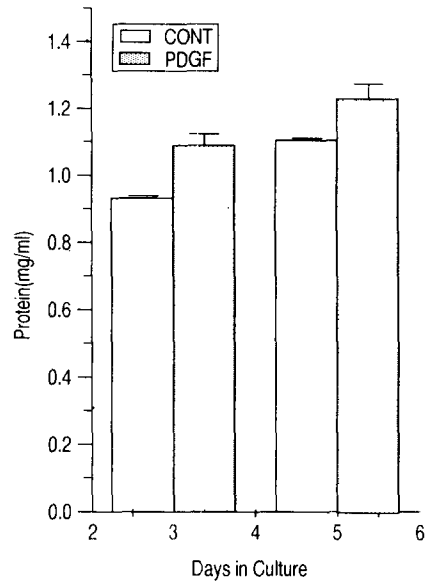
Values are mean±S.E. , n=3.

CONT : Control group

PDGF : Platelet-derived growth factor-BB



**Fig 5. The determination of protein in rat calvaria cell treated with PDGF**



**Fig 6. The determination of protein in rat periodontal ligament cell**

을 살펴보면 배양 4일째 처음 결절이 골간질 세포에서 먼저 관찰되었다. 결절은 원형으로

주위에 세포가 밀집되어 있으며, 결절 중앙 부위가 진하게 농염되고 주위로 연하게 염색

되는 양상을 보였다.

1.5×1.5cm<sup>2</sup>의 장방형의 격자내에 형성된 결절수를 비교한 결과, 골간질세포 배양 7일째에 대조군보다 PDGF 처치군이 35%가량 결절수

가 많았다. 배양 10일째에는 더 유의적인 차이를 보였다(Table 7과 Fig 7). 치주인대세포에서도 이와 유사한 양상을 보였으나 골간질세포보다 결절수가 많지는 않았다(Table 8과 Fig 8).

Table 7. The effect of PDGF on the nodule formation in the rat bone stromal cell

Days in Culture	No. of nodule	
	cont	PDGF
7	26.3±5.56(100%)	35.4±1.07(134.6%)
10	46±2.67(100%)	62.7±3.78(136.3%)

Values are mean±S.E. , n=3.

CONT : Control group

PDGF : Platelet-derived growth factor-BB

Table 8. The effect of PDGF on the nodule formation in the rat periodontal ligament cell

Days in Culture	No. of nodule	
	cont	PDGF
7	15±3.33(100%)	26.7±6.2(178.0%)
10	47±4.67(100%)	54±4(114.8%)

Values are mean±S.E. , n=3.

CONT : Control group

PDGF : Platelet-derived growth factor-BB

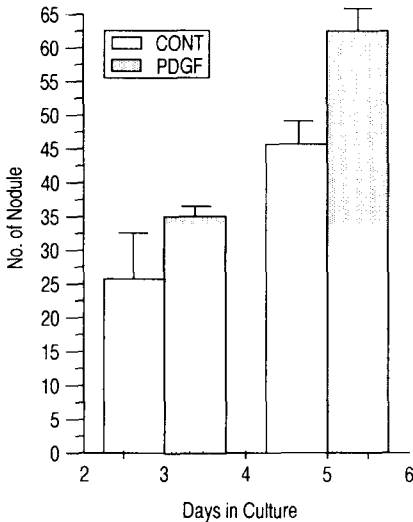


Fig 7. The effect of PDGF on the nodule formation in the rat calvaria cell

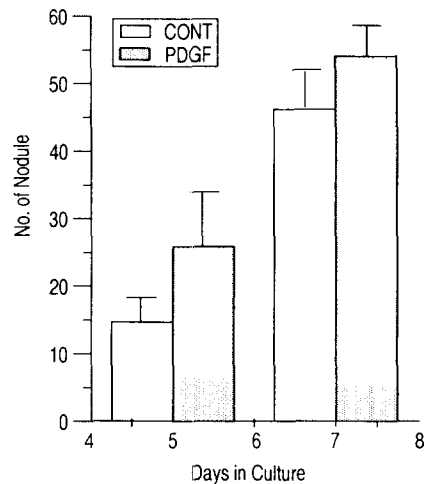


Fig 8. The effect of PDGF on the nodule formation in the rat periodontal ligament cell



#### IV. 총괄 및 고찰

염증으로 인해 파괴된 골손상부에 신생골 형성에는 골유도와 골전도로 대별하여 생각할 수 있다. 골유도란 골형성인자 영향으로 골간질세포가 연골과 골로 분화되어가는 과정이다. 과거부터 골세포 기원에 관한 2가지 학설이 있었다. 그 중 하나는 생후 새로운 골은 골막, 골내막, 골수세망중의 전골아세포로부터 생성한다고 하는 학설과 새로운 골형성 세포는 골수세망, 골내막, 골막과 주위의 근육 결합조직중에 존재하는 간엽세포의 유도로 보충된다고 하는 학설이다. 골전도는 이식체 수급부의 이식골 혹은 이식편에 새로운 모세혈관, 골형성세포가 침입하여 증식하는 과정을 말한다. 골전도는 고압멸균한 골, 탈회골, 동결건조한 골등의 살아있지 않은 생체재료에서 그리고 Glass, 생도재등의 인공생체재료 중에서 야기된다. 비생체 재료중 이식재가 흡수되지 않아도 골전도는 야기되며 자가골이식이 수급부와 결합하는 과정에는 골유도와 골전도가 상호 혼합된 과정이다. 그리고 동종 및 이종골이식의 골형성에는 골전도가 중요하다.

치주조직은 조직학적으로 치은, 치주인대, 백악질 그리고 치조골등 4가지 상이한 조직이 상호연결된 복합구조로 구성되어 있다. 또한 치주조직 자체는 두 개의 경조직인 치근 표면의 백악질과 치조골사이에 콜라겐섬유를 지닌 연조직이 존재하여 치아를 고유 위치에 상존하게 하여 상호연결하는 형태의 구조를 가진 특수한 형태를 지니고 있다. 이러한 구조에 치태침착으로 인해 조직파괴가 야기되어 고유 기능을 상실하는 것이 치주질환이며 상실된 지지조직을 재생한다는 의미는 치아를 고유위치에 잔존시켜 저작기능을 완성하게 하는 것이다.

염증성 치주질환시 치조골 파괴기전은 세균성 치태대사산물로 인해 치주조직내의 파골

전구세포로 분화하는 경우, 골기질을 가수분해시키는 경우, 치은세포의 분비물질이 골흡수효소에 보조역할을 하는 경우 및 치은세포가 직접 골파괴를 유도하는 물질을 분비하는 경우등으로 야기된다고 알려져있다. 파괴된 치조골을 회복하기 위해서 먼저 현존하는 원인요소를 제거한 후 해부학적 및 생리학적 양호한 구강내 환경으로 개선시킨 다음 골조직 재생을 위한 외과적 처치를 시술하는것이 일반적 개념이다.

치주질환 치료법에 대한 연구로는 과거에는 질환에 이환된 부위만을 제거하는 치은절제술이 소개되었다. 이는 치주낭을 제거함으로써 병적조직을 제거하게 되어 치유를 도모하게 되었다. 그러나 각화 부착치은의 양이 부족하거나 골내낭이 동반된 경우에는 임상적용의 제한성과 어느 정도의 정상 조직삭제를 감수해야하며 건강조직 역시 함께 절제되어야 하는 단점이 있고, 인접치아의 지지조직 약화와 노출된 치근면에 상아질과민증등의 합병증이 야기될 단점이 지적되었다. Schallhorn (1972)<sup>18)</sup> 따라서 가능한 한 절제조직량을 감소화하면서 치주낭을 제거하는 시술형태로 발전된 변형 위드만씨법 Ramfjord(1977, 1974)<sup>19, 20)</sup>이 발표되기에 이르렀다.

최근, 연구는 병적 치주낭의 삭제와 아울러 치아표면을 변화시켜 치주조직 구성세포들이 치근표면에 용이하게 부착하게 하려는방향으로 전환되었다. Parodi와 Esper(1984)<sup>21)</sup>는 인체의 연구에서 구연산으로 인한 치조골 재생과 신부착관찰에서 미약한 효과만 발견하였고 Register와 Burdick (1976)<sup>22)</sup>은 치근면에 산을 처리한 경우가 그렇지 않은 경우보다 신속한 재부착을 보고하며 치근면 처리가 신부착 가능성을 증가시킬수 있다고 주장하였고 Boyko등 (1980)<sup>23)</sup>과 Hanes등(1991)<sup>24)</sup>도 동일한 의견을 제시하였다. 이와 같이 학자간에 논란의 여지가 없진 않지만 현재에는 구연산의 치면처리가 치유과정에 긍정적인 효

과를 갖는 것이 일반적인 견해로 인정되고 있다.

그러나 일반적인 치주수술후에 치은상피세포가 치근단 방향으로 이주하게 된다는 후유증을 차단하고 치주조직세포를 선택적으로 성장번식을 유도하는 연구가 진행되어 조직유도재생술이 개발되었다. 조직유도재생술에 사용된 초기 재료로는 Millipore filter<sup>25, 26, 27, 28)</sup>를 사용하였으며,

그 후 생물학적 적합성이 우수하다고 알려진 Expanded Poly-tetra-fluoro-ethylene membrane<sup>29, 30, 31)</sup>이 소개되어 현재 임상에서 널리 활용되고 있다.

그러나 치근의 외형이 심한 만곡이 있거나 치근체 (Root trunk) 전장의 길이에 따라 성공율의 감소가 발생할 수 있다는 보고 Lu (1992)<sup>32)</sup>도 있어 적응증 판단시 주의를 요하고 있다.

무엇보다도 치주질환의 최종적 결과는 치조골소실로 인한 치아발거이므로 치료술식은 소실된 치조골회복이란 점에 집중되었다. 치조골재생에 대한 연구에는 특히 신생골형성의 모체가 되는 골아세포의 분화과정이 가장 중요한 바 골아세포의 기시점을 규명하는 연구들이 진행되었다.

그 결과 골아세포의 분화 가능성에 대한 연구에서 첫째 Melcher와 Eastoe(1979)<sup>33)</sup>는 치주인대조직내에 백악아세포와 골아세포 및 치주인대세포로 분화할 수 있는 복합잠재능 (Multipotential)을 가진 세포가 존재한다고 하였고, 두번째로 골아세포로 분화할 수 있는 특수한 세포가 존재한다는 보고도 있었으며 Matsuda(1992)<sup>34)</sup>, 마지막으로 혈관주위세포가 치조골쪽으로 이주하여 골아세포로 분화할 수 있는 가능성도 있다<sup>2)</sup>고 알려졌다. 그러나 백악아세포, 골아세포 및 치주인대섬유아세포가 동일한 부위에서 유래되는지 혹은 각 세포형은 그들 고유의 전구세포형을 가지고 있는지에 대해서는 아직 정확히 규명되어 있지

않다. Lynch(1989)<sup>35)</sup>

각종 세포들의 고유성상이 규명됨에 따라 세포의 화학주성이 밝혀지기 시작하였고, 조직치유과정에서 신속한 세포증식과 일정한 방향으로의 이동이 가장 중요한 조직반응이라는 점이 Lynch(1989), Ross(1989)<sup>36, 37)</sup> 제시됨에 따라 치주조직세포 역시 그 성장규명이 이어져 이들 세포의 성장 및 증식속도를 변화시켜 세포의 활성화를 촉진하여 파괴된 조직을 회복하려는 시도가 진행되었다.

세포성상을 생물학적으로 조절하는 요소에 대한 연구에서 Polypeptide Growth Factor (PGF)가 조절인자로써 가장 중요한 것으로 나타났다. 이중 상처부 치유에 관여하는 성장인자에 대해서는 Platelet-Derived Growth Factor(PDGF), Epidermal Growth Factor 등이 국소부위에서 중배엽세포를 조절하므로 중요하다고 알려져 있다<sup>3)</sup>.

치의학 영역에서는 Terranova 등(1987)<sup>38)</sup>이 세포의 화학주성에 있어서 성장인자가 Fibronectin 보다 만배 이상의 능력을 가졌다고 보고하면서 조직재생과 관련된 성장인자의 역할에 대한 관심이 집중되었다. 또한 Terranova 등<sup>3)</sup>은 PGF가 다양한 세포의 생명력 유지와 성장촉진에 있어서 중요한 역할을 한다고 하였으나 PGF의 합성과 분비의 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않고 있다.

본 실험에 사용된 PDGF는 PGF 중의 하나로서 Ross 등(1978, 1986)<sup>10, 11)</sup>과 Kohler와 Lipton(1974)<sup>8)</sup>이 각각 혈소판으로부터 동맥의 평활근세포의 증식을 자극하는 물질이 발견되었다. 또한 PDGF를 유리하는 세포는 혈소판 이외 단핵세포 및 대식세포, Megakaryocyte, 내피세포외에도 다수의 세포<sup>10, 11)</sup> 등이 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 PDGF는 Hawiger(1989)<sup>39)</sup>에 의해 유리과정이 보고되었다. 즉 혈소판내에는  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\lambda$ -Granule, Peroxisome 등의 4 가지 종류의 요소가 있는데 그 중  $\alpha$ -granule로부터 PDGF가 유리된다

고 보고하였다.

PDGF가 조직재생에 미치는 영향의 원리는 상처발생 직후 최초로 혈소판이 침착되고 혈괴가 형성되면 처음 나타나는 세포는 과립세포, 단핵세포 및 임파구이다. PDGF는 이때 혈소판, 단핵세포 그리고 손상받은 내피세포에 의해 다른 성장인자와 함께 분비된다. 이때 혈소판으로부터 유래된 PDGF에 의해 초기에 백혈구와 섬유아세포를 이주하게하고 대식세포로부터 유래된 PDGF는 섬유화과정에 주된 역할을 한다. 즉 혈괴가 형성될 때 혈소판과 손상받은 내피세포 그리고 상처부속으로 들어가 대식세포로 전환된 단핵세포로부터 유래된 PDGF는 섬유아세포의 이주와 증식 그리고 신생 결합조직의 형성을 야기한다<sup>11)</sup>.

본 연구에서 PDGF를 실험재료로 선정한 원인은 골유래세포 배양시 PDGF를 첨가한 경우 세포의 증식율이 촉진되었다는 Piché와 Graves(1989)<sup>40)</sup>의 연구와 또한 Rutherford등(1992)<sup>41)</sup>은 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF의 효과를 규명한 실험에서 각 세포의 증식에 유효하다는 보고를 근거로 하였다.

그리고 생체실험에서 Lynch 등<sup>5)</sup>은 PDGF나 IGF-I를 단독으로 치주결손부에 적용하였을 때 생체내에서 2주일 이내에 신생 치조골과 신생 백악질의 형성을 자극할 수 있다고 하였으며 PDGF와 IGF-I를 혼용하였을 때 그 효과는 상승효과가 있다고 하였다. 또한 Lynch 등(1991)<sup>42)</sup>은 Press-fit titanium implants 주위에 PDGF와 IGF-I를 처치하면 매식체 주위로 신속한 치조골의 형성을 보고하였다.

#### <세포증식>

본 연구에서 나타난 세포증식속도에서 PDGF를 투여한 경우 치주인대세포와 골간질세포가 공히 뚜렷하게 증식속도가 빠르게 변

화됨을 알 수 있었다. 이는 양세포의 세포벽에 PDGF의 수용체가 많이 존재한다는 사실을 의미하며 골조직은 일생동안 지속적으로 재생되는 대사조직이다. 골대사과정은 동일조직내에서 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포에 의한 골형성이 상호 보완적 혹은 상호 견제적인 현상으로 동시에 발견되는 결합현상(Coupling phenomenon)이라 할 수 있다. 이러한 골흡수와 형성의 균형정도를 평가하는 데는 과거 골교체를(Bone turnover rate)을 이용하였으나 최근에는 생화학적 표지자(Biochemical marker)를 이용하게 되었다. 즉 골형성의 생화학적 표지자로서는 Osteocalcin(Bone gla-protein), Procollagen I carboxylterminal extension peptide 등이 사용되고 Alkaline phosphatase activity도 많이 사용된다. 본 연구결과 PDGF를 투여한 경우 골화 잠재능을 가진 세포에서는 ALPase activity가 증가되는 현상을 확인하여 양 세포의 광화작용에도 영향이 미치는 것으로 밝혀졌다.

이와 같은 현상은 ALPase는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로서 석회화를 유도하는 기능을 갖는다.

골관련 단백질에 대한 광범위한 연구에도 불구하고, 골형성기전에 있어서 이들의 정확한 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다. 그러나, 이들 단백질들은 칼슘염과 인산염에 결합하는 성질을 가지며 수산화인회석에 대한 친화성이 높은 특징을 보이기 때문에, 수산화인회석 결정체 형성의 핵으로 작용하고 핵의 성장과 용해와 같은 조절과정에도 관여할 것으로 생각된다.

그러나 ALPase 활성도, 부갑상선 호르몬에 대한 반응 또는 교원질과 골관련 단백질의 합성이 조골세포에서만 나타나는 특징적인

성질이라고 볼 수 없기 때문에, 현재로서는 석회화 결절의 형성이 치주인대세포가 조골세포와 유사함을 보이는 가장 결정적인 증거가 될 수 있다. Ramakrishnan은 석회화 결절형성과정을 네단계로 구분하여, 배양용기내 세포밀도가 치밀한 단층을 이룬 다음, 계속적인 세포의 분열로 세포가 중층을 이루는 부위가 나타나게 된다고 하였다.

다음 단계에서는, 세포가 밀집된 부위에 기질이 침착되어 결절을 형성하게 되고, 마지막으로 기질이 석회화되어 완전히 석회화된 결절형성이 이루어지게 된다고 하였다.

#### <단백질 합성능에 대해>

#### <석회화결절형성에 대해>

본 실험을 통해 치주인대세포가 경조직 재생 과정에 관여함을 확인하였고 이후 치주조직을 구성하는 세포들간의 복합적인 상호작용에 대한 지속적인 연구가 필요하리라고 생각된다.

### V. 요약

본 연구는 기존 조직의 재생능력을 활성화하는 것으로 알려진 Platelet-Derived Growth Factor-BB를 치주조직의 구성요소중 가장 중요한 역할을 하는 치주인대세포와 골세포에 작용시켜 골조직형성에 미치는 영향을 생물학적 표식자를 이용하여 분석하고자 실시하였다. 본 연구에서는 양 세포들의 증식속도를 측정하여 세포분열에 미치는 영향을 분석한 다음 세포가 형성하는 총단백질의 양을 측정하여 분화과정에 기여하는 반응을 확인한 다음 석회화과정에 어떻게 작용하는가를 시험관 실험을 통해 분석한 결과 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 치주인대세포와 골간질세포의 증식양상

은 혈소판유래성장인자를 함유한 경우 그 속도가 빠르게 나타났다.

2. 치주인대세포와 골간질세포의 Alkaline phosphatase 활성도는 PDGF-BB에 의해 배양 3일째에 골간질세포는 14%, 치주인대세포는 24.4%가 증가하였다.
3. 치주인대세포와 골간질세포의 단백질 합성능력은 PDGF-BB에 의해서 각각 배양 3일째에 15%, 5% 증가하였다.
4. 치주인대세포와 골간질세포에서 관찰된 석회화 결절수는 PDGF-BB에 의해 유의적인 증가를 보였다.

이상의 결론으로 미루어 혈소판유래성장인자는 치주인대세포와 골간질세포 양자 공히 세포증식속도에 영향을 미치며 석회화과정에 기여하는 중요한 요소임을 알 수 있었으며 이러한 효과는 파괴된 치주조직 생생술에 응용가능성이 높다고 판단된다.

### 참고문헌

1. Melcher, A.H. : On the repair of periodontal tissues. J. Periodontol., 47 : 256-260, 1976.
2. Roberts, W.E. and Chase, D.C. : Kinetics of proliferation and migration associated with orthodontically-induced osteogenesis. J. Dent. Res., 60 : 174-181, 1981.
3. Terranova, V.P., Goldman, H.M. and Listgarten, M.A. : The periodontal attachment apparatus. cited in Genco, R.J., Goldman, H.M. and Cohen, D.W. : Contemporary Periodontics. The CV Mosby Co., St. Louis, pp 33-54 1990
4. Terranova, V.P. and Wikesjö, UME. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions

- of cell of the periodontium, *J. Periodontol* 58 : 371-380, 1987.
5. Lynch, S.E., Nixon, J.C., Colvin, R.V. and Antonides, H.N. : Role of platelet-derived growth factor in wound healing : Synergistic effects with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7696-7700, 1987.
  6. Lynch, S.E., Colvin, R.B. and Antonides, H.N. : Growth factors in wound healing : Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds, *J. Clin. Invest.*, 84 : 640-646, 1989.
  7. 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.
  8. Kohler, N. and Lipton, A. : Platelets as a source of fibroblast growth promoting activity, *Exp. Cell Res.*, 87 : 297-301, 1974.
  9. Antoniades, H.N., Scher, C.D. and Stiles, C.D. : Purification of human platelet-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 : 1809-1813, 1979.
  10. Ross, R. and Vogel, A. : The platelet-derived growth factors, *Cell*, 14 : 203-210, 1978.
  11. Ross, R., Raines, E.W. and Bowen-Pope, D.F. : The biology of platelet-derived growth factor, *Cell*, 46: 155-169, 1986.
  12. Canalis, E., McCarthy T.L. and Centrella M. : Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro, *J. Cell. Physiol.* 140: 530-537, 1989.
  13. Deuel, T.F., Huang, J.S., Proffitt, R.T., Baenziger, J.U., Chang, D. and Kennedy, B.B. : Human platelet-derived growth factor, *J. Biol. Chem.*, 256 : 8896-8899, 1981.
  14. Greenhalgh, D.G., Sprugel, K.H., Murray, M.J., and Ross, R. : PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse, *Am. J. Pathol.*, 136: 1235-1246, 1990.
  15. Schwartz, S.M., Foy L., Bowen-Pope D.F. and Ross R. : Derivation and properties of platelet-derived growth factor-independent rat smooth muscle cells, *Am. J. Pathol.*, 136 : 1417-1428, 1990.
  16. Sprugel, K.H., McPherson J.M., Clowes, A.W., Ross, R. : Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers, *Am. J. Pathol.*, 129 : 601-613, 1987.
  17. Sprugel, K.H. : PDGF and impaired wound healing, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 365: 327-340, 1991.
  18. Schallhorn, R.G. : Postoperative problems associated with iliac transplants, *J. Periodontol.*, 43 : 3-6, 1972.
  19. Ramfjord, S.P. : Present status of the modified widman flap procedure, *J. Periodontol.*, 48 : 558-561, 1977.
  20. Ramfjord, S.P. and Nissle, R.R. : The modified widman flap, *J. Periodontol.*, 45 : 601-606, 1974.
  21. Parodi, R.J. and Esper, M.E. : Effect of topical application of citric acid in the treatment of furcation involvement in human lower molars, *J. Clin. Periodontol.*, 11: 644-651, 1984.
  22. Register, A.A. and Burdick, F.A. : Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized

- in situ, *J. Periodontol.*, 47 : 497-505, 1976.
23. Boyko, G.A., Brunette, D.M. and Melcher, A.H. : Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro, *J. Periodontol. Res.*, 15 : 297-303, 1980.
  24. Hanes, P., Polson, A. and Frederick, T. : Citric acid treatment of periodontitis-affected cementum : A scanning electron microscopic study. *J. Clin. Periodontol.*, 18 : 567-575, 1991.
  25. Nyman, S. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 290-296, 1982.
  26. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T.L., and Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 11: 494-503, 1984.
  27. Gottlow, J. and Nyman, S. : New attachment formation in the human periodontium by Guided tissue regeneration. Case reports, *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 604-616, 1986.
  28. Magnusson, I. : Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing, *J. Periodont. Res.*, 20 : 201-208, 1985.
  29. Stahl, S.S., Froum, S.J. and Tarnow, D. : Human histologic response to guided tissue regenerative techniques in intrabony lesions. Case reports on 9 sites, *J. Clin. Periodontol.*, 17: 191-198, 1990.
  30. Pontariero, R., Lindhe, J., Nyman, S., Karring, T., Rosenberg, E. and Sanavi, F. : Guided tissue regeneration in degree II furcation involved mandibular molar. A clinical study, *J. Clin. Periodontol.*, 15 : 247-254, 1988.
  31. Park, J.B., Matsuura, M., Han, K.Y., Norderyd, O., Lin, W-L., Genco, R.J., and Cho, M.I. : Periodontal regeneration in Class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J. Periodontol.*, 66 : 462-477, 1995.
  32. Lu, H.J. : Topographical characteristics of root trunk length related to guided tissue regeneration, *J. Periodontol.*, 63: 215-219, 1992.
  33. Melcher, A.H. and Eastoe, J.E. : The connective tissue of the periodontium, In cited from Melcher, A.H. and Bowen, W.H. : *Biology of periodontium*, Academic Press, New York(1979), P. 167.
  34. Matsuda, N., Lin, W.-L., Kumar, N.M., Cho, M.I. and Genco, R.J. : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, *J. Periodontol.*, 63 : 515-525, 1992.
  35. 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.
  36. Lynch, S.E., Colvin, R.B. and Antoniades, H.N. : Growth factors in wound healing : Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds, *J. Clin. Invest.*, 84 : 640-646, 1989.
  37. Ross, R. : Platelet-derived growth factors, *Lancet*, 27 : 1179-1182, 1989.

38. Terranova, V.P., Franzetti, L., Hic, S. and Wikesjö, U.M.E. : Biochemical mediated periodontal regeneration, *J. Period. Res.*, 22: 248-251, 1987.
39. Hawiger, J. : Platelet secretory pathway : An overview, *Method. enzym.*, 169: 191-195, 1989.
40. Piché, J.E. and Graves, D.T. : Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: A comparison with human fibroblasts, *Bone*, 10: 131-138, 1989.
41. 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.
42. Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A. et al. : Effects of the platelet-derived growth factor/Insulin-like growth factors-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs, *J. Periodontol.*, 62 : 710-716, 1991.

## **A study of the effects of PDGF-BB on the characteristics of bone stromal and periodontal ligament cells**

Young-Hyuk Kwon, Joon-Bong Park

Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung-Hee University

The main goal of periodontal therapy is to restore the lost periodontal tissue and establish the attachment apparatus. Current acceptable therapeutic techniques are included : removal of diseased soft tissue, demineralization of exposed root surface, using the barrier membrane for preventing the downgrowth of gingival epithelial cell, insertion of graft materials as a scaffolding action, and biological mediators for promoting the cell activity. The latest concept one among them has been studied which based on the knowledge of cellular biology of destructed tissue.

Platelet-derived growth factor(PDGF) is one of the polypeptide growth factor which have been reported as a biological mediator to regulate activities of wound healing progress including cell proliferation, migration, and metabolism.

The purposes of this study is to evaluate the influences of the PDGF as biological mediator to periodontal ligament and bone marrow cell.

Both right and left maxillary first molar were extracted from rat which had treated with 0.4%  $\beta$ -Aminopropionitril for 5 days, and feeded until designed date to sacrifice under anaesthesia. Periodontal ligament were removed from the extracted socket of the rat, and cultured with Dulbecco's Modified Essential Medium(DMEM) contained with 10% Fetal Bovine Serum, 100U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 0.5 $\mu$ g/ml amphotericin-B. Bone marrow cell were culture from bone marrow suspension with which washed out from femur with same medium.

The study was performed to evaluate the effect of PDGF to periodontal ligament and bone cell, cell proliferation rate, total protein synthesis, and alkaline phosphatase activity of rat periodontal ligament(PDL) cell and bone stromal(RBS) cell in vitro. The effects of growth factors on both cells were measured at 3, 5th day after cell culture with(control group) or without growth factors(experimental group).

The results were as follows:

1. The tendency of cell proliferation under the influence of PDGF showed more rapid proliferation pattern than control at 3 and 5 days after inoculation.



2. The activity of Alkaline phosphatase revealed 14, 80% increased respectively at 3, 5 days culture than control group.

Measurements of ALPase levels indicated that PDL cells had significantly higher activity when compared with that of co-culture groups and GF only ( $P < 0.05$ ). And, ALPase activity in 10 days was higher than that of 7 days ( $P < 0.05$ ).

3. The tendency of formation of the mineralized nodule were observed dose-depend pattern of PDL cells. There was statistically significant difference among group 1(PDL 100%), 2(PDL 70%:GF 30%), and 3(PDL 50%:GF 50%) ( $P < 0.01$ ). But, there was no difference among group 3, 4(PDL 30%:GF 70%), and 5(GF 100%).

4. Also, the number of nodule was greater in co-culture of PDL 70% and GF 30% than in culture of PDL 70% ( $P < 0.05$ ).

From the above results, it is assumed that the PDGF on PDL cells and RMB cell culture.

GF stimulates the cell growth, which is not that of PDL cells but GF. And, the activity of ALPase depends on the ratio of PDL cells, and ALPase may relate to the initial phase of nodule formation. Also, it is thought that the calcified nodule formation principally depends on PDL cells, is inhibited by GF, and affected by cell density.

In conclusion, platelet-derived growth factor can promote rapid osteogenesis during early stage of periodontal tissue regeneration.