포도당 및 인슐린이 인체 치은섬유모세포와 치주인대세포에 미치는 영향

한희란 · 김응태 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주조직의 만성 염증성 질환들은 전신적으로 건강한 환자들보다 호르몬과 대사 이상이 나타나는 당뇨환자에서 더욱 심하게 나타난다[1].

당뇨는 인슐린 부족, 과혈당, 그리고 혈관과 말초신경내의 미성숙 변성변화가 특징적으로 나타나는 질환이며[3], 당내성의 변화나 지방과 탄수화물의 대사이상을 포함하는 이종성 장애이다[4].

당뇨환자에서 볼 수 있는 치주조직에 대한 유해한 효과들은 대사이상에 대한 조절부족과 연관되어 있는 것으로 보고되었으며[5, 6], 조절되지 않은 당뇨환자에서 치주질환이 급속하게 진행된다고 하였다[4]. 따라서 대사이상에 대한 안정은 치과치료의 중요한 부분의 하나이지만[7], 치주질환과 당뇨사이의 병리적 관련성에 대해서는 논란의 여지가 많다.

포도당의 증가된 농도는 여러 측면의 세포기능에 직접적 효과를 가지고 있는 것으로 보고되었지만, 당뇨상태시 나타나는 대사이상과 조직변화에 대해서 여러 상반되는 실험적, 임상적 자료가 보고되었다[3]. Rosenbloom과 Rosenbloom[10]은 인슐린 의존형 당뇨환자와 정상인으로부터 배양한 세포들간에 생활력에서는 차이가 없었지만 세포내에서는 노후발현과 고유의 결함이 나타난다고 보고하였다. Rowe등[11]은 정상개체의 세포들에서보다 인슐린 의존형 당뇨환자로부터 배양한 피부 섬유모세포에서 교원질이 더 많이 합성된다고 하였으며, glycosaminoglycans에 대해서도 인슐린 의존형 및 비의존형 당뇨환자로부터 배양한 피부섬유모세포에서 heparan sulfate가 증가된다고 주장하였다.

반면, Martin 등[12], Vracko와 Benditt[13], 그리고 Goldsteine 등[14, 15]은 당뇨환자의 피부섬유모세포를 배양하여 대조군 세포와 비교한 결과 복제 수명이 감소되었다는 것을 발견하였다. Weringer와 Arquilla[16], Goldstein[17]은 피부섬유모세포에 대한 연구에서 과혈당 상태일 때 세포분화와 성장이 감소된다고 보고하였으며, Weringer와 Arquilla[16], Lien 등[18], Seibold 등[19]은 교원질과 glycosminoglycan합성도 감소된다고 하였다. el-Kishky 등[20]은 당뇨환자에서 배양한 치은섬유모세포가 비당뇨인에 비해 교원질을 적게 합성한다고 하였으며, Ramamurthy 등[21], Golub 등[22], Sasaki 등[23]은 실험적으로 당뇨를 유도한 쥐에서 조골세포가 골기질 요소를 생산하는 것이 저해되

었고, 치은섬유모세포 및 치수인대세포도 교원질을 적게 합성하는 것으로 나타났다고 보고하였다.

치은의 가장 중요한 부분은 치은 결체조직이다. 비용해성인 세포외 기질은 건강한 조직과 병적인 조직 모두에서 결체조직의 견고도를 유지시키는 중요한 역할을 한다고 보고되었으며[25, 26], 교원질과 탄성질은 비섬유성 당단백질과 음이온성proteoglycan과 같이 주요한 구조적 성분들을 형성한다[27]. 세포외 기질내에 존재하는 이런 거대분자들의 성분과 분포양상에서의 변형들은 조직의 생리적 상황에 특정한 영향을 미칠 수 있을 것이다. Seibold 등[19), 29-31]은 과혈당 상태에서 교원질은 분자들간의 비효소성 glycosylation과 교차결합 과정을 통해서 용해성과 교체속도를 감소시킨다고 하였으나, Golub 등[22, 32]은 이런 교원질이 감소된 경우에 인슐린을 첨가하면 용해도가 거의 정상으로 회복되어질 수 있다고 주장하였다. Wilfred 등[1]은 인간 섬유모세포를 배양하여 실험한 결과 인슐린이 포도당의 이용, RNA 대사, 그리고 단백질 합성등을 자극한다고 보고하였고, 세포를 배양하여 인슐린을 첨가한 대부분의 경우에 성장이 증진되는 것으로 나타났다[43].

따라서 본 연구는 건강한 치은섬유모세포와 치주인대세포에 대하여 포도당 및 인슐린이 미치는 세포활성과 교원질 합성량을 측정함으로써 이들이 당뇨환자의 치주조직에 미치는 영향을 추론해 보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 치주인대세포 및 치은섬유모세포의 세포배양

본 실험에 사용된 치은섬유모세포와 치주인대세포는 원광대학교 치과병원에 내원한 환자중 교정치료를 위해 발거된 소구치의 치은조직과 치수인대조직로부터 얻어졌다. 발거된 치아는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Co., USA)이 담겨있는 15㎖ 튜브에 담아 혈액이나 이물질을 제거하기 위해 3회 세척하였다. 세척된 치아를 fetal bovine serum(FBS, Gibco Co., USA) 10%와 항생제(Penicillin G 10,000 units/㎖, Amphotericin B 25μg/㎖, Gibco Co., USA) 1%가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)이 들어 있는 100mm 조직배양 접시에 옮겨 15번 수술도를 사용하여 치주인대세포 배양을 위해 치근 중간 1/3부위의 치주인대 조직을 큐렛으로 떼어낸 후 1mm^{2}으로 세절하고, 치은섬유모세포 배양을 위해 치근 상부에 있는 치은조직을 떼어내어 1mm^{2}으로 세절한 후, 60mm 배양접시에 5 6개 조각을 고르게 분포시켰다. 약 30분간 37℃, 100%습도, 5% CO_2 배양기에서 배양하여 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 DMEM 3㎖을 첨가하였다. 단일세포층이 형성될 때까지 2 3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 단일세포층이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후, 0.25% Trypsin/EDTA(1×, Gibco Co., USA)를 이용하여 세포배양 접시에 부착된 세포를 분리시킨 후 60mm 조직배양용 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 2 3일 간격으로 교환하였고 계대배양은 1:3 4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 4 8회 계대배양된 치은섬유모세포와 치주인대세포를 이용하였다.

2. MTT assay에 의한 세포활성도 측정

5 8회 계대배양한 단일세포층의 치은섬유모세포와 치주인대세포를 trypsin으로 처리한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당 1×10^{4}의 세포를 분주한 후 1일

농안 CO_2 배양기에서 배양하여 20, 50mM의 포도당을 첨가하여 배양액에서 5일동안 세포 배양을 실시하였다. 그후 103, 104, 105mU/l의 인슐린을 첨가하여 48시간동안 혈청이 없는 배지에서 배양하였다. 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배양액을 제거하고, 새 배양액 1㎖을 각 well에 첨가하였다. 이어서 24-well plate에 부착되어 있는 세포의 양을 알아보기 위해 생리식염수에 용해한 3- (4, 5-dimethylthiazol -2 -yl) -2, 5 -diphenyl tetrazolium bromide용액(MTT, Sigma Co., L.O., USA)200㎕를 각 well에 첨가한 후 3시간 동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 200㎕의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Co., USA)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA 분석기(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Tokyo, Japan)로 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포활성도는 대조군의 백분율로 산출하였고, 각 실험은 4회 반복하여 실시하였다.

3. 교원질 합성량

치주인대세포와 치은섬유모세포의 총 교원질양을 간접적으로 측정하기 위하여 hydroxyproline의 함량을 측정하였다. 각각의 세포를 1×10^4의 세포수로 60mm plate에 분주한 후 20, 50mM의 포도당을 첨가하여 배양액에서 5일동안 세포배양을 실시하였다. 그후 103, 104, 105mU/l의 인슐린을 첨가하여 48시간동안 serum-free medium에서 배양한 후 배양한 세포를 수거하였다. 배양 배지내에 죽은 세포를 제거하기 위해 1,500rpm에서 5분간 원심분리한 후 10N HCl 3㎖을 첨가하고, 각 세포는 trypsin-EDTA로 분리시켜 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 6N HCl 3㎖을 첨가하였다. 110℃에서 10-24시간 가수분해 시킨 다음 각 시료를 여과하였다. 시료는 duplication하여 100㎕씩 취하였다. 완전히 건조시킨 다음 methanol 50㎕를 가하고 남아있는 염산이 제거될 때까지 60℃에서 배양하였다. 1.2㎖ 50% isopropanol을 넣어 남은 침전물을 용해하고, 200㎕ chloramin-T 용액과 섞어 10분간 방치하였다. 1.2㎖의 Ehrlich반응 시약을 넣어 섞은 후, 50℃에서 90분간 배양한 다음 상온에서 식혔다. 교원질 합성량 측정은 표준곡선(0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5㎍/㎖)을 표준지표로 하여 558nm에서 흡광도를 spectrophotometer (Beckman DU-650, USA)로 측정하였다.

4. 통계분석

사전검정으로 분산분석을 시행한 후 사후검정으로 대조군과 농도별 실험군간의 평균치 차이를 Duncan검정법을 이용하여 시행하였으며, 분석에 사용된 유의수준은 0.05와 0.01이었다.

Ⅲ. 결과

1. 세포활성도

치은섬유모세포와 치주인대세포에 포도당을 처리한 경우 치은섬유모세포는 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 세포활성도의 증가가 있었으나 20mM과 50mM의 농도간에 세포활성도에서의 차이는 없었다(표 1).

치주인대세포의 경우에는 대조군에 비해 20mM과 50mM 포도당 농도에서 세포활성도에서의 변화가 없었으며 각 농도간의 차이도 없었다(표 2).

포도당으로 전처리하여 당뇨를 유도한 세포에 대한 인슐린의 효과는 유의수준 0.05와 0.01에서 치은섬유모세포와 치주인대세포에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(표 3, 4).

표 1 Effects of glucose on cell activity of gingival fibroblasts

Concentration	0mM(control)	20mM	50mM
Cell activity	100.00±1.10	123.84±4.92*#	121.58±12.8*

* : Significantly different from the control ($p<0.05$)
# : Significantly different from others test group ($p<0.01$)
Data were expressed as mean(%)±S.D.

표 2 Effects of glucose on cell activity of PDL cells

Concentration	0mM(control)	20mM	50mM
Cell activity	100.00±0.18	98.45±1.28	99.13±1.37

* : Significantly different from the control ($p<0.01$)
Data were expressed as mean(%)±S.D.

표 3 Effects of insulin on cell activity of glucose-pretreated gingival fibroblasts

Insulin \ Glucose	20mM	50mM
I×(control)	100.00±3.97	100.00±10.60
10^3mU/l	103.03±4.74	102.94±5.00
10^4mU/l	102.53±2.27	106.93±3.51
10^5mU/l	102.95±5.27	104.86±2.55

Data were expressed as mean(%)±S.D.
I×: No insulin

표 4 Effects of insulin on cell activity of glucose-pretreated PDL cells

Insulin \ Glucose	20mM	50mM
I×(control)	100.00±1.30	100.00±1.34
10^3mU/l	98.66±3.13	99.67±1.30
10^4mU/l	98.96±2.27	100.08±1.24
10^5mU/l	99.08±2.67	99.82±0.33

Data were expressed as mean(%)±S.D.
I×: No insulin

2. 교원질 합성량

20mM 포도당으로 전처리하여 당뇨를 유도한 치은섬유모세포에 인슐린을 투여한 경우 교원질 합성량에 거의 변화가 없었으나 50mM 포도당으로 전처리한 경우에는 10^3과

표 5 Effects of insulin on collagen synthesis of glucose-pretreated gingival fibroblasts

Insulin \ Glucose	20mM	50mM
I×(control)	100.00±16.78	100.00±6.99
10^3mU/l	127.04±35.78	166.74±5.98*#
10^4mU/l	107.72±33.33	117.72±10.35*
10^5mU/l	121.78±11.68	106.36±10.59*

* : Significantly different from the control ($p<0.05$)
# : Significantly different from others test group ($p<0.01$)
Data were expressed as mean(mg/ml)±S.D.
I×: No insulin

표 6 Effects of insulin on collagen synthesis of glucose-pretreated PDL cells

Insulin \ Glucose	20mM	50mM
I×(control)	100.00±8.70	100.00±1.04*
10^3mU/l	120.67±10.83	115.51±1.20*
10^4mU/l	108.50±25.57	37.71±1.63*
10^5mU/l	216.19±5.80*	84.69±1.28*

* : Significantly different from others test group ($p<0.01$)
Data were expressed as mean(mg/ml)±S.D.
I×: No insulin

10^4mU/l 농도의 인슐린 투여시 통계학적으로 유의한 수준의 교원질 합성량의 증가가 나타났으며, 10^3mU/l의 인슐린 농도에서 가장 높은 교원질 합성량을 나타내었다($p<0.05$)(표 5).

치주인대세포의 경우에는 20mM의 포도당으로 전처리한 후 10^5mU/l의 인슐린을 첨가한 경우에 대조군과 다른 농도의 인슐린을 투여한 군에 비해 통계학적으로 유의한 수준의 교원질 합성 증가를 보였다($P<0.05$, 0.01). 50mM glucose로 전처리한 경우에서는 10^3mU/l의 인슐린 농도에서는 교원질 합성이 증가되었으나 10^4mU/l의 인슐린 농도에서 현저한 교원질 합성 감소가 나타났으며, 10^5mU/l의 인슐린 농도에서 감소된 교원질 합성량이 약간 회복되는 경향을 보였다($p<0.05$)(표 6).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

당뇨는 구강건강과 치주창상 치유에 큰 영향을 미치는 전신적 질환이다[33].

조절되지 않은 당뇨는 외과적 창상치유에 해로운 영향을 끼치고 섬유모세포의 비정상적 증식과 불량한 골재생에 관련되어지며[33], 치주질환을 중계하는 것으로 생각되어지는 세포들인 섬유모세포, 다형핵백혈구, 단핵구세포와 염증과정, 면역반응같은 생리적 과정들에도 영향을 끼치는 것으로 나타났다[34].

당뇨환자의 상처가 치유되는 기전은 명확하지 않지만, 감염 민감성에 작용하는 변화된

세포활성의 죽적된 효과가 상처치유에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 상처변연에 존재하는 교원질의 glycosylation은 용해성을 감소시키고 상처부위의 재형성을 지연시킨다. 덧붙여, 증가된 collagenase는 새로이 합성되지만 불완전하게 교차결합된 교원질을 분해하여 결함있는 상처치유에 기여한다고 보고되어졌다[18, 35]. 결합조직의 반응은 상처치유 모델에서 연구되어졌다. 쥐에서의 피부상처 치유에 관한 연구에서 정상적으로 조절되고 있는 상처가 가장 강하고 단단하였으며 반면, 유전적으로 당뇨에 걸린 쥐의 상처는 가장 약하고 가장 낮은 탄성력을 가진 것으로 나타났다[4]. 또한 당뇨환자에서 보이는 치은섬유모세포와 치주인대세포에 의한 교원질 합성과 collagenase생산의 변화가 상처치유에 있어 중요한 역할을 할 것으로 사료되기 때문에 이 세포들에 대한 영향을 규명하여 그 결과를 임상적으로 응용하는 것이 바람직하다고 할 수 있다.

인간의 치은섬유모세포와 치주인대세포는 치주치료와 밀접하게 관련되어 있고 골유도재생술같은 외과적 술식의 성공에 중요하기 때문에 본 실험에서 사용되어졌다.

본 실험결과는 비조절된 당뇨환자에서 나타나는 농도인 20mM과 50mM에서 치은섬유모세포는 세포활성도가 증가되었으나, 각 포도당 농도사이에는 세포활성도에 있어 유의한 차이가 없었다. 반면, 치주인대세포의 경우는 20mM과 50mM에서 포도당이 세포활성도에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고, 각 포도당 농도사이에 세포활성도에 있어서도 유의한 차이가 없었다. 따라서 비조절된 당뇨환자에서의 포도당 농도에 의한 세포활성도의 차이는 없는 것으로 사료되며, 또한 포도당에 대한 반응이 조직간에 다를 수 있다는 것을 알 수 있었다. 위의 결과는 치은섬유모세포가 포도당에 대해 증식되거나 영향을 받지않는 반면 치주인대세포의 성장은 억제된다는 Ohgi와 Johnson[33]의 연구결과와 어느정도 일치한다고 할 수 있지만 포도당이 치주인대세포의 활성도에 영향을 미치지 않았다는 점에서는 약간의 차이가 관찰되었다. 이런 차이가 나타난 원인으로는 포도당의 배양시간에 대한 차이와 사용한 배지내에 fetal bovine serum의 첨가 여부에 의한 것으로 사료된다.

그러나 피부섬유모세포에 대한 연구에서 과혈당상태가 세포분화와 성장을 감소시킨다고 주장한 Weringer와 Arquilla[16], Goldstein[17]의 결과와는 대조적으로 나타났다.

20, 50mM 농도의 포도당으로 5일간 배양하여 당뇨를 유도한 치은섬유모세포와 치주인대세포에 인슐린을 첨가시 세포활성도에 미치는 영향에 대한 실험결과는 인슐린이 치은섬유모세포와 치주인대세포 모두의 세포활성도에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

반면, 치은섬유모세포에 대한 교원질 합성량에 대한 실험결과는 세포를 20mM 농도의 포도당으로 배양한 후 인슐린을 첨가한 경우에는 교원질 합성량에서의 변화가 거의 없었고 각 인슐린 농도간에도 차이가 없었으나 50mM농도의 포도당으로 배양한 경우에는 교원질 합성의 증가가 나타났으며 103mU/l의 인슐린 농도에서 최대의 교원질 합성증가를 보였다. 치주인대세포에 대한 교원질 합성량은 20mM농도의 포도당으로 배양한 후 인슐린을 첨가한 경우에 10^3, 10^4mU/l의 인슐린 농도에서는 교원질 합성량에서의 변화가 거의 없었으나 10^5mU/l의 인슐린 농도에서는 현저한 교원질 합성량의 증가를 보였으며 50mM의 포도당으로 배양한 후 인슐린을 첨가한 경우에는 10^3mU/l의 인슐린 농도에서는 교원질 합성량이 증가하였으나 10^4mU/l의 농도에서는 현저한 교원질 합성의 감소가 나타났다. 이런 감소된 교원질 합성량이 10^5mU/l의 인슐린 농도에서는 다시 회복되는 경향을

보였으나 더욱 확실한 양상을 알기 위해서는 더 높은 농도에서의 실험이 필요할 것으로 사료된다. 또한 치은섬유모세포에서 10^3mU/l의 인슐린 농도가 최대의 교원질 합성량을 야기하였고 치주인대세포의 경우도 20mM의 포도당으로 배양한 경우를 제외하고는 10^3mU/l 의 인슐린 농도에서 최대의 합성량이 관찰되었다. 위의 실험결과는 피부섬유모세포에 대한 실험에서 인슐린에 의해 교원질 합성이 자극되어진다고 보고한 Kjellstrom 과 Malmquit[37]의 연구결과 인간 섬유모세포를 배양하여 실험한 Wilfred 등[1]의 연구결과와 일치한다.

한편, 본 실험에서 치은섬유모세포는 고농도의 포도당에 의해 성장이 억제되지 않았지만, 치주인대세포의 경우에는 고농도의 포도당(50mM)이 인슐린의 효과를 약간 저해하는 것으로 나타났다. 배지내에서 현저하게 증가된 포도당 농도가 주로 총단백질 합성에 대한 인슐린 효과를 저해한다는 약간의 보고들이 있었으며 더 진전된 연구들이 진행중이다[37].

위의 실험들의 의미는 임상가들이 비조절성 당뇨환자의 치주수술후에 치은섬유모세포가 증식될 것을 예상할 수 있도록 해주고, 인슐린의 투여가 당뇨환자에서의 교원질 합성에 미치는 영향을 알 수 있도록 해주므로서 창상치유 양상과 같은 환자관리에 있어 중요하게 작용할 것이다.

각 포도당 농도에 대해서 인슐린의 효과가 다르게 나타난 이번 실험 결과는 당뇨환자에서의 혈중 포도당 농도에 대한 조절정도가 외과적 창상치유에 영향을 미칠 수 있다는 것을 의미하므로 치과치료에 대해서 잠재적인 중요성을 갖을 것으로 사료된다. 이 사실은 치주인대 세포의 분열과 이주가 신생골 형성에 있어 필수적인 조직유도 재생술같은 술식에 대해서도 매우 관련이 깊을 것이며, 또한 포도당과 인슐린의 증가된 농도에 대한 치은섬유모세포와 치주인대세포의 반응은 당뇨환자의 창상치유에 중요한 역할을 할 것이다. 잠재하고 있는 전신적 상황의 조절이 이런 환자들의 치과치료에서 중요하기 때문에 포도당과 인슐린에 대한 반응과 관련된 분자적 변화는 당뇨환자의 치과치료와 관련된 변화를 이해하는데 중요할 것으로 사료되며, 이런 지식은 당뇨환자들의 치과치료가 앞으로 변화될 방향을 제시할 수도 있을 것이다.

V. 결론

치은섬유모세포와 치주인대세포에 20mM과 50mM의 포도당을 처리하여 5일간 배양한 후 인슐린으로 배양한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay결과 포도당은 치은섬유모세포의 세포활성도를 증가시켰으나, 치주인대세포의 세포활성도는 감소시키거나 거의 영향을 미치지 않았다. 인슐린은 포도당으로 전처리한 치은섬유모세포와 치주인대세포의 세포활성도에 거의 영향을 미치지 않았다.
2. 교원질 합성능 결과는 치은섬유모세포의 경우는 20mM의 포도당 농도에서는 거의 변화가 없었으나 50mM의 포도당으로 배양한 경우에는 인슐린에 대해 합성능이 증가하는 경향으로 나타났으며 10^3mU/l의 인슐린 농도에서 최대의 합성량을 보였다. 치주인대세포의 경우는 20mM농도의 포도당으로 배양한 경우에는 10^5mU/l의 인슐린 농도에서 최대의 합성량 증가를 보였으며 50mM의 포도당 농도로 배양한 경우에는 10^3mU/l의 인슐린 농도에서 최대의 합성량을 보였다. 50mM의 포도당으로 치주인대세포를 배양한 경우 고농도의 포도당(50mM)이 인슐린의 효과를 저해하는 것으로 나타났다.

본 연구결과 포도당의 세포활성도에 대한 영향은 조직들간에 차이가 있을 수 있으며, 인슐린은 20mM의 포도당으로 배양한 치주인대세포를 제외하고는 10^3mU/l의 인슐린 농도에서 교원질 합성량을 최대로 증가시킴을 알 수 있었다.

Ⅵ. 참고문헌

1. Wilfred Y., Fujimoto M.D., and Robert H., Williams M.D. Insulin action on cultured human fibroblast: glucose uptake, protein synthesis, RNA synthesis. Diabetes: 1974: 23: 443-448.
2. Hugoson A., Thorstensson H., Falk H., Kuylenslierna J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes. J Clin Periodontol. 1989: 35: 476-480.
3. David W., Rowe M.D., Barbra J., Starman B.S., Wilfred Y., Fujimoto M.D., and Robert H., Williams M.D., Seattle. Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblast cultures from patients with diabetes mellitus. Diabetes. 1977: 26: 284-290.
4. Research, Science and Therapy Committe of The Academy of Periodontology. Position paper Diabetes and periodontal diseases. J Periodontol. 1996: 67: 166-176.
5. Ervasti T., Knuuttila M., Pobjamo L., Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. J Periodontol. 1985: 56: 154-157.
6. Tervonen I., Knuuttila M. Relation of diabetes control to periodontal bleeding and alveolar bone level. Oral Surg. 1986: 61: 346-349.
7. Ainamo J., Lahtinen A., Uitto V.J. Rapid periodontal destruction in adult humans with poorly controlled diabetes: 8 report of two cases. J Clin Periodontol. 1990: 17: 22-28.
8. Glavind I., Lund B., Loe H. Relationship between periodontal state and diabetes duration, insulin dosage and retinal changes. J Periodontol. 1968: 39: 341-347.
9. Rosenthal l.M., Abrams H., Kopezyk A. Relationship of inflammatory periodontal disease to diabetic status in insulin-dependent diabetes mellitus patients. J Clin Priodontol. 1988: 15: 425-429.
10. Rosenbloom A.L., Rosenbloom E.K. Insulin-dependent childhood diabetes. Normal viability of cultured fibroblast. Diabetes. 1978: 27: 338-341.
11. Rowe D.W., Starman W.Y., Fujimoto R.H., Williams. Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblast cultures from patients with diabetes mellitus. Diabetes. 1977: 26: 248-290.
12. Martin G.M., Sprague C.A., and Epstein C.J. Replicative life-span of cultivated human cells: effects of donor's age, tissue, and genotype. Lab. Invest. 1970: 23: 86-93.
13. Vracko R., and Benditt E.P. Restricted replicative life-span of diabetic fibroblast in vitro: its relation to microangiopathy. Fed. Proc. 1975: 34: 68-70.
14. Goldstein S., Littlefield J.W. and Soeldner J.S. Diabetes mellitus and aging: diminished plating efficiency of cultured human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 1969: 64: 155-160.
15. Goldstein S., Niewiarowski S. and Singal

D.P. Pathological implications of cell aging in vitro. Fed. Proc. 1975: 34: 56-63.
16. Weringer E.J, Arquilla E.R. Wound healing in normal and diabetic Chinese hamsters. Diabetologia. 1981: 21: 394-401.
17. Goldstein S. Cellular and molecular biological studies on diabetes mellitus. Pathol Biol (Paris). 1984: 32: 99-106.
18. Lien Y.H, Stern R., Fu J.C.C., Siegel R.C. Inhibition of collagen fibril formation in vitro and subsequent cross-linking by glucose. Science. 1984: 225: 1489-1491.
19. Seibold J.R, Uitto J., Dorwart B.B., Prockop D.J. Collagen synthesis and collagenase activity in dermal fibroblasts from patients with diabetes mellitus and digital sclerosis. J Lab Clin Med. 1985: 105: 664-667.
20. el-Kishky M., Mahfouz S.A., el-Habbak S.M. An in vitro study of hydroxyproline synthesis by gingival fibroblasts in patients with juvenile diabetes. Egypt Dent J. 1986: 32: 15-27.
21. Ramamurthy N.S., Zebrowski E.J., Golub L.M. Insulin reversal of alloxan-diabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. J Periodontol Res. 1974: 9: 199-206.
22. Golub L.M., Schneir M., Ramamurthy N.S. Enhanced collagenase activity in diabetic rat gingiva.: In vitro and in vivo evidence. J Dent Res. 1978: 57: 520-525.
23. Sasaki T., Ramamurthy N.S., Golub L.M. Insulin-deficient diabetes impairs osteoblast and periodontal ligament fibroblast metabolism but does not affect ameloblasts and odontoblasts: Response to tetracycline administration. J Biol Buccale. 1990: 18: 215-226.
24. Hascall V.C. & Hascall G.T. Proteoglycans. Cell biology of extracellular matrix, Hay, E. D. Fed. Plenum Press, New York. 1981: 39-63.
25. Albert B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D. Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim. 1986: 609-679.
26. Ten Cate A.R. The fibroblast and its products. Oral histology. Development, Structure and Function. The Mosby Company. 1985: 88-100.
27. Lark M.W. & Culp L.A. Multiple calsses of heparan sulphate proteoglycans from fibroblast substratum adhesion sites: affinity fraction on columns of octylsepharose. J. Biol. Chem. 1984: 259: 6773.
28. Somerman M.F., Foster R.A., Vorsteg G., Progebin K. & Wynn R.L. Effects of monocycline on fibroblast attachment and spreding. J. Periodont. Res: 1988: 23: 154-159.
29. Vlassara H. Non-enzymatic glycosylation. Diabetes Annual. 1991: 6: 371-389.
30. Salmela P.I, Oikarinen A., Pirttiaho H., Knip M., Niemi M., Ryhanen L. Increased non-enzymatic glycosylation and reduced solubility of skin collagen in insulin-dependent diabetic patients. Diabetes Res. 1989: 11: 115-120.
31. Cohen M.P. Non-enzymatic glycosylation. Diabetes Annual. 1984: 4: 469-484.
32. Golub L.M., Garant P.R., Ramamurthy

N.S. Inflammatory changes in gingival collagen in the alloxan-diabetic rat. J Periodont Res. 1977: 12: 402-418.
33. Ohgi S., Johnson P.W. Glucose modulates growth of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells: correlation with expression of basic fibroblast growth factor. J Periodont Res. 1996: 31: 579-588.
34. Golub L.M., Michael Schneir and Ramamurthy N.S. Enhanced collagenase activity in diabetic rat gingiva: In vitro and in vivo evidence. J Dent Res: 1978: 57: 520-525.
35. Schneir M.L., Ramamurthy N.S., Golub L.M. Extensive degradation of recently synthesized collagen in gingiva of normal and sterptozotocin-induced diabetic rats. J Dent Res: 1984: 63: 23-27.
36. Petrides P.E., Bohlen P. The mitogenic activity of insulin. (An intrinsic property of the melecule). Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980: 95: 1138-1144.
37. Kjellstrom T. and Malmquit J. Insulin effects on collagen and protein production in cultured human skin fibroblasts from diabetic and non-diabetic subjects. Horm. Metab. Res: 1984: 16: 168-171.
38. Pfeifle B., Ditschuneit H.H., Dischuneit. Insulin as a cellular growth regulator of rat arterial smooth muscle cells in vitro. Horm. Metab. Res: 1980: 12: 381-385.
39. Sasaki T., Ramarmurthy N.S., Golub L. Insulin-deficient diabetes impairs osteoblast and periodontal ligament fibroblast metabolism but does not affect ameloblasts and odontoblasts: response to tetracycline administration. J Biol Buccale: 1990: 18: 215-226.
40. Termi R., Tavella D., Donnelly P., Di Ferrante N., Hill L., Lynn C., Hatton D. Cultured fibroblasts of juvenile diabetes have excessively soluble pericellular collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980: 92: 1071-1075.
41. Hamlin C.R., Kohn R.C., Luschkin J.H. Apparent accelerated aging of human collagen in diabetes mellitus. Diabetes. 1975: 24: 902-904.
42. Kohn, R.R., Hensse S. Abnormal collagen in cultures of fibroblasts from human beings with diabetes mellitus. Biochem. Biophys. Res. Commun: 1977: 76: 765-771.

-Abstract-

Effect of Glucose and Insulin on Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Cells

Hee-Ran Han, Eung-Tea Kim, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin
Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

Diabetes mellitus is a systemic disease with profound effects on oral health and periodontal wound healing. Uncontrolled diabetes adversely affects surgical wound healing and is often associated with abnormal proliferation of fibroblasts. Human gingival fibroblasts and PDL cells were chosen because they are intimately involved in periodontal therapy and are important for the success of surgical procedure such as guided tissue regeneration.

The aim of the present study was to elucidate whether cellular activity and collagen synthesis by glucose pre-treated human gingival fibroblasts and PDL cells are influenced by insulin, and whether healthy cells differ from glucose treated cells.

Cells were cultured with DMEM at 37℃, 5% CO_2, 100% humidified incubator. To evaluate the effect of glucose on gingival fibroblasts and periodontal ligament cells, the cells were seeded at a cell density of 1×10^4 cells/well culture plates and treated with 20 and 50mM of glucose for 5 days. Then MTT assay was carried out. To evaluate the effect of insulin on glucose-pretreated cells, the cells were seeded at a cell density of 1×10^4 cells/well culture plates and treated with 20 and 50mM of glucose for 5 days. After incubation, 10^3, 10^4 and 10^5mU/l of insulin were also added to the each well and incubated for 2 days, respectively. Then, MTT assay and collagen synthesis assay were carried out.

The results indicate that cellular activity of gingival fibroblasts significantly increased by glucose while periodontal ligament cells were unaffected and cellular activity of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells were unaffected by insulin.

Collagen synthesis of gingival fibroblast with 20mM glucose and insulin unaffected, but 50mM glucose and insulin increased than control. Collagen synthesis of periodontal ligament cell with 20mM glucose and 10^5mU/l insulin significantly increased than other groups and 50mM glucose pretreated PDL cells significantly increased at 10^3mU/l insulin but decreased at 10^4mU/l insulin.

Our findings indicated that these cell types differed in their growth response to glucose, and the increase in collagen synthesis was significantly raised at insulin level of 10^3mU/l in gingival fibroblasts and periodontal ligament cells except 20mM glucose pretreated periodontal ligament cells.