

기계적 자극에 대한 백서 치주인대 섬유아세포의 변화

김태균 · 김창성 · 조규성 · 채중규 · 김종관 · 최성호

연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소

I. 서론

치주조직은 치은, 치주인대, 백악질, 치조골 4가지로 구성되어 있다. 이 중 백악질은 치주학, 교정학, 근관치료학 분야에서 임상적으로 매우 중요하게 인식되어 백악질의 재생을 목적으로 한 여러 연구가 행해져왔다.¹⁾

백악질은 치근 표면을 덮고있는 특수한 석회화 조직으로 골과 유사하지만 골과는 달리 신경이나 혈관, 림프관이 없고 별도의 흡수와 침착의 시기없이 일생 동안 새로운 층이 침착되면서 그 두께가 증가한다.²⁾ 또한 백악질에는 치주인대 섬유들이 함입, 부착되어 있어 치근이 손상되었을 때 치유에 관여하기도 한다.^{3,4)} 1986년 Schroeder는 백악질을 무세포성 무섬유성 백악질 (Acellular afibrillar cementum, AAC), 무세포성 외인성 섬유계 백악질 (Acellular extrinsic fiber cementum, AEFC), 세포성 혼합 섬유계 백악질 (Cellular mixed stratified cementum, CMSC), 세포성 내인성 섬유계 백악질 (cellular intrinsic fiber cementum, CIFIC)의 4가지로 새롭게 분류하였다.⁵⁾

치주 치료후의 치유는 치근면에 처음 부착하는 세포의 종류에 따라 여러 방향으로 이루어질 수 있으며, 가장 이상적인 치유 양상은 치주인대 섬유아세포

의 분화에 의해 백악질과 골이 재생되고 치주인대 섬유가 수직으로 매입되어 치주조직이 구조적, 기능적으로 재생되는 것이다. 그러나 실제로 대부분의 조직 치유는 긴 접합상피로 이루어지며⁶⁾, 이를 막기 위하여 여러 가지 술식이 개발되어 왔다. 치근면 처치, 골이식술, 차폐막을 이용한 조직유도재생술, 성장인자의 적용 등 다양한 연구가 이루어졌고 동물실험 및 임상연구 결과 상당한 치주조직 재생효과를 보였으나 백악질의 재생은 제한적이었다. 최근에 특히 백악질의 재생을 위하여 돼지의 치배에서 범랑기질 단백질 (Enamel matrix proteins: Emdogain[®], Biora)을 분리해냈으며, 치주 결손부에 적용후 조직학적으로 관찰한 연구에서 신생 결합조직 부착과 신생골 형성 뿐 아니라 교원질 섬유가 매입된 신생 백악질이 형성됨을 보고하였다.^{6,8)} 이때 형성된 백악질은 무세포성이며 치근 표면에 단단히 부착되어 있었다.^{7,8)} 또한 최근의 임상결과에 의하면 Emdogain[®] 적용시 유의한 임상부착수준의 증가와 방사선학적 골밀도 및 골량의 증가가 있었다.^{9,10)}

백악질의 재생을 연구하기 위해서는 백악아세포를 선택적으로 분리, 분화시킬 수 있는 in vitro 실험 모델과 백악질 형성을 자극할 수 있는 조건을 명시한 in vivo 실험모델의 개발이 요구된다. 많은 노력

*이 연구는 2000년도 연세대학교 치과대학의 연구비 지원에 의한 결과임.

교신저자: 최성호, 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 120-752

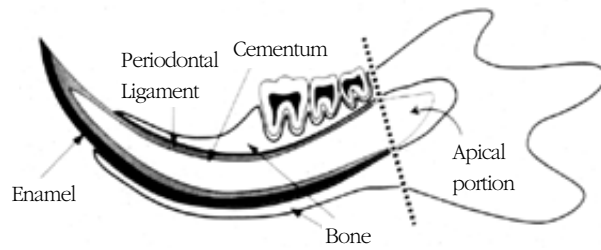


Figure 1. Schematic drawing of rat incisor

에도 불구하고 아직까지 백악아세포의 순수 분리와 배양은 이루어지지 않고 있으며 in vivo에서 조건 변화에 따라 백악아세포가 형성될 것을 기대하고 이를 관찰하고자 하는 노력을 해왔다. 이런 연구 모형 중 쥐의 절치를 이용한 연구는 간편하고 경제적이며 백악아세포의 형성을 비교적 쉽게 유도할 수 있어 in vitro 실험에 대한 가능성을 제시하여 준다. 쥐의 절치는 형태학적으로 설측면에만 치주인대와 백악질이 존재하며 대부분의 동물에서 관찰되는 바와 같이 치근의 교합면 1/3은 주로 무세포성 외인성 섬유계 백악질(AEFC)로 치근단 2/3는 주로 세포성 백악질로 구성되어 있다.¹¹⁾ (Figure 1)

많은 연구에서 치주인대 세포는 환경의 변화에 따라 백악아세포 혹은 조골세포로 분화될 수 있음을 제시하였다.¹²⁻²⁰⁾ 1987년 Roberts는 쥐의 치주인대 섬유아세포가 조골세포로 분화되는 것을 보고하였으며,²⁰⁾ 임상적으로 교정장치에 의한 과도한 견인력, 과도한 교합력에 의해 과백악질증이 유발됨을 관찰하였다.^{21,22)} 이로 미루어보아 쥐의 치주인대 섬유아세포에 기계적인 자극을 주면 백악아세포의 활성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 백서에 단단한 먹이를 주어 사육함으로써 치주인대 섬유아세포에 기계적 자극을 가하여 분화를 촉진시킨 결과 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

체중 80-100g의 수컷흰쥐 30마리를 사용하였다. 실험 시작 전 이들의 치주조직은 임상적으로 양호하였고 전신적 질환이 없는 건강한 상태였다.

2. 실험방법

1) 실험군 설정

일반적인 먹이로 사육한 군을 대조군으로, 단단한 먹이로 사육한 군을 실험군으로 하였다. 실험군은 사육 후 각각 1주, 2주에 희생하여 관찰하였으며 각 군별로 10마리씩 실험하여 총 30마리를 사용하였다.

2) 조직학적 소견

절치를 백악질 부위까지 포함하여 잘라낸 다음 EDTA로 탈회시킨후 EPON에 포매하여 microtome을 사용하여 1 μ m로 자른 다음 PAS와 toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

3) Northern analysis

단단한 먹이로 사육한지 1, 2주 후에 발거된 절치의 치주인대 섬유아세포와 백악질을 채취하여 TRI reagent^{®*}를 첨가하여 조직의 세포가 완전히 파괴되도록 잘 혼합하고 잘게 분쇄하였다.

그 후 원심분리기의 tube에 담아 5분간 실온에 방치하여 핵 단백질 복합체가 풀어지도록 하였으며, Tube에 0.2ml의 chloroform을 넣고 잘 섞어준 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000g에서 15분간 원심분리하였다. RNA로 이

* : TRI reagent[®], Molecular research center, USA

루어진 상층액만을 취하여 다른 tube에 담고 0.5ml의 iso-propanol을 첨가하고 5-10분간 실온에 방치한 후 4℃, 12,000g에서 8분간 원심분리하였고, 상층액을 제거하고 침전된 RNA를 1ml의 75% 에탄올로 2회 세척한 후 실온에서 건조시키고 Diethyl Pyrocarbonate(DEPC) 처리를 거친 증류수에 녹인 후 RNA의 농도를 측정하여 10 μ g의 total RNA를 2.2M formaldehyde를 함유하고 있는 1% agarose gel 상에서 전기영동시켰다. 이를 Hybond N plus nylon(Amersham, Arlington Heights, IL)로 전이시킨

후 [α -³²P]dCTP로 labeling된 alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein(BSP), osteocalcin(OC), osteopontin(OPN), type I collagen, GAPDH와 같은 다른 probe를 사용하여 hybridization시켰다. 그 후 각 probe를 사용할 때마다 filter를 2 \times SSC, 0.05%SDS로 실온에서 20분간 세척하고 0.1 \times SSC, 0.1% SDS로 20분간 50℃에서 2회 세척한 후 -70℃에서 film에 노출시켜 그 정도를 확인하였다. 그 후 다음 hybridization을 위하여 Hybond N plus nylon을 10분간 0.5% SDS에 넣어 끓임으로써 방사능 활성을 제거하였다.

III. 연구결과

1. 조직학적 소견

시간이 경과됨에 따라 치주인대 섬유아세포가 상아질쪽으로 이주하여 신장되어 있는 양상이 관찰되었고 (Figure 2-a,b) 백악아세포로 분화한 후 신생백악질을 형성하였으며 (Figure 2-c) 일부에서 즉시 석회화되는 유백악질로 함유된 백악세포 소견이 관찰되었다. (Figure 2-d)

2. Northern analysis

Figure 3은 1주, 2주 후 시간경과에 따른 ALP, BSP, OC, OPN, type I collagen mRNA 발현을 보여준다. 시간이 경과될수록 특히 BSP, OC, type I collagen mRNA 발현이 증가하였다. 그에 비해 ALP의 발현은 시간이 경과됨에 따라 증가하는 변화를 보이지 않았다.

IV. 총괄 및 고찰

치주 조직의 재생은 치주인대 세포, 조골 세포, 그리고 백악아세포의 이주와 함께 이들 세포들의 증식과 기질 합성에 의해 이루어지며, 치주 조직이 구조적, 기능적으로 파괴전의 형태로 회복되는 상태를 말한다. 치주인대로부터 유래한 세포들은 신부착을 형

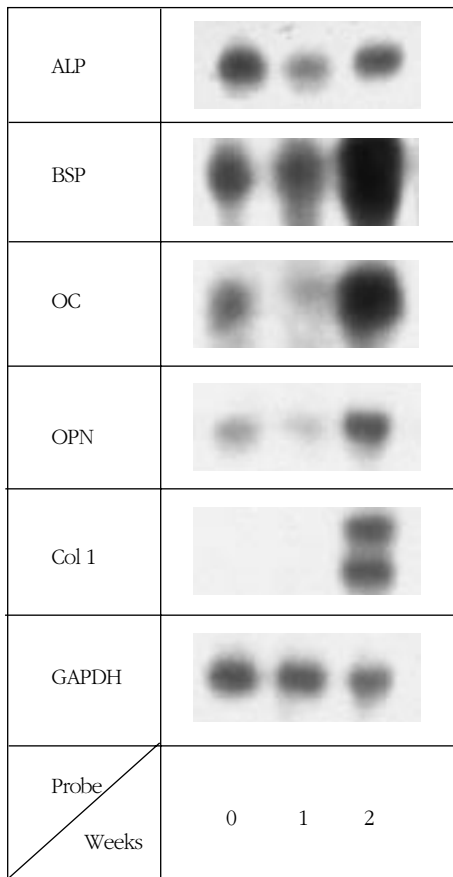


Figure 3. Expression of alkaline phosphatase, bone sialoprotein, osteocalcin, osteopontin, type I collagen mRNA in PDL & cementum. Quantitative GAPDH levels were then used to normalize bone marker mRNA levels.

Table 1. Comparison of gene expression (mRNA) for Type I collagen, BSP, OPN, and OC

| mRNA | Osteoblast | PDL | Cementoblast |
|-----------------|------------|-----|--------------|
| Type I collagen | +++ | +++ | +++ |
| BSP | ++ | - | +++ |
| OPN | + | - | ++ |
| OC | +++ | - | ++ |

Intensity of mRNA signal: -=absence/none, +=low level, +=moderate level, +++=high level.

성할 수 있는 능력을 가지고 있으나 치주인대 내의 미분화세포가 분화되어 새로운 치주 조직을 형성하는 속도보다 상피세포의 이주속도가 빨라 재생이나 신부착을 위한 치주 치료의 결과가 사실은 긴 접합상피 부착으로 이루어지게 된다. 이러한 상피세포의 이주를 막기 위해 차폐막이 효과적으로 사용되어왔으나, 이는 재생에 필요한 선택적 세포들의 능동적 이주, 증식, 기질 합성을 촉진하지는 않는다.

최근, 치주 조직 재생을 위한 생물학적 접근의 일환으로 법랑 기질 단백질(Enamel matrix protein, Emdogain®)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 법랑 기질 단백질은 치아의 초기 발생 단계에서 Hertwig 상피 근초의 세포들에 의해 분비되는 물질로, 백악질의 형성을 자극하며 치주 인대와 치조골의 재생에 기초를 마련한다. 또한 Hammarström 등²³⁾은 돼지의 법랑기질을 원숭이의 치근면에 실험적으로 형성한 열개형 골결손부에 적용시 치근면에 단단히 부착된 무세포성 백악질이 형성되었다고 보고하였다. 또한 1997년 오등²⁴⁾은 1면 골결손부에서 법랑기질 유도체의 이식은 신생 백악질 형성에 우수한 효과를 보였으며 접합상피의 근단이동억제와 신생골 형성에도 약간 증진된 효과가 있는 것으로 보고하였다.

이에 본 연구는 단단한 먹이로 사육한 백서의 절치 모델을 사용하여 백악아세포가 기계적 자극에 의해 치주인대 섬유아세포로부터 분화되는 양상을 관찰하였다. 실험군의 조직학적 소견(Figure 2-a~d)은 기계적 자극을 받은 치주인대 섬유아세포가 신장되어 상아질 쪽에 밀집되어 있는 양상을 나타내며 점차 백악질의 두께가 두꺼워지는 소견을 나타낸다. 이

로 미루어보아 시간이 경과함에 따라 치주인대 섬유아세포들이 치근 상아질 쪽으로 이주하여 새로운 세포로 분화되고 광화된 기질을 형성한다고 사료된다.

치주인대 섬유아세포로부터 새로이 분화된 세포의 분자생물학적 성질 변화를 규명하기 위해 Northern 분석을 시행하여 BSP, OC, OPN, Type I collagen mRNA의 발현 양상을 관찰하였다(Figure 3). 이러한 결과는 치주인대 섬유아세포의 발현 양상과 상이한 것이며 성숙한 백악질과 유사한 것이다.²⁵⁾ (Table 1) 1998년 MacNeil²⁵⁾ 등은 조골세포와 백악아세포는 발현하는 단백질이 거의 유사하나 조성에서 차이를 보인다고 하였고, 조골세포의 경우 OC의 발현이, 백악아세포의 경우 BSP, OPN의 발현이 조금 더 강하므로 OPN과 BSP가 백악질의 주요 구성성분이라 하였다. 기계적 자극을 가한 치주인대 섬유아세포는 빠른 속도로 백악아세포로 분화되었으며 과중한 교합력을 치근 하부조직으로 균일하게 분포시키기 위해 신생 백악질의 침착과 광화를 유도하였다.

본 연구 결과는 백악질이 치주조직의 환경변화에 대하여 적응하는 생물학적 활성 조직임을 암시하며 이러한 백악질의 특성은 치주조직 재생에 매우 중요한 역할을 담당한다.²⁶⁾ 아직까지 치주조직의 재생기간 동안 백악질의 형성과 광화를 조절하는 인자에 대한 명확한 해답은 없으나 이러한 문제 해결을 위한 향후 연구는 신생백악질의 형성을 예측하는 새로운 방향의 치주 치료방법을 제시할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 연구에 사용된 백서의 절치 모델은 치주 조직 재생 연구에 필요한 백악아세포의 분리과 배양에 효과적일 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 백서에 단단한 먹이를 주어 사육함으로써 치주인대 섬유아세포에 기계적 자극을 가하여 분화를 촉진시킨 후, 그 변화 양상을 조직학적, 분자생물학적으로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시간이 경과될수록 치주인대 섬유아세포가 상아질쪽으로 이주하여 백악아세포로 분화한 후 신생백악질을 형성하는 것을 관찰할 수 있다.
2. 1주동안 단단한 먹이로 사육한 백서에 비해 2주로 가면서 백악아세포의 특이 단백질을 표현하는 BSP, OC, OPN, type I collagen의 mRNA 발현이 우세함을 보였다.

결론적으로 본 연구에서는 단단한 먹이로 사육한 백서의 질치 모델을 사용하여 치주인대 섬유아세포로부터 백악아세포의 분화와 신생백악질 형성을 관찰할 수 있었으며 본 연구에서 사용된 백서의 질치 모델은 향후 백악아세포의 분리와 연구에 효과적으로 사용될 수 있으리라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Louridis, O., Bazopoulou-Kyrkanidou, E., Demetriou, N. : Age effect upon cementum width of albino rat: a histometric study, J. Periodontol., 43(9): 533-536, 1972.
2. MacNeil, R.L., Sommerman, M.J. : Molecular factors regulating development and regeneration of cementum, J. Periodont. Res., 28: 550-559, 1993.
3. Zander, H.A., Hurzeler, B. : Continuous cementum apposition, J. Dent. Res., 37: 1035-1042, 1958.
4. Kronfeld, R. : Biology of the cementum, J. Am. Dent. Assoc., 25: 1451-1462, 1938.
5. Schroeder, H.E. : The Periodontium, Berlin:

Springer-Verlag, 12-22, 1986.

6. Hammarstrom, L. : Enamel matrix, cementum development and regeneration, J. Clin. Periodontol., 24: 658-668, 1997.
7. Hammarstrom, L., Heijl, L., Gestrelus, S. : Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins, J. Clin. Periodontol., 24: 669-677, 1997.
8. Heijl, L. : Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report, J. Clin. Periodontol., 24: 693-696, 1997.
9. Sculean, A., Reich, E., Chiantella, G.C., Brex, M. : Treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative (Emdogain): A report of 32 cases, Int. J. Periodontics Restorative Dent., 19: 157-163, 1999.
10. Heijl, L., Heden, G., Svardstrom, G., Ostgren, A. : Enamel matrix derivative (Emdogain) in the treatment of intrabony periodontal defects, J. Clin. Periodontol., 24: 705-714, 1997.
11. Beertsen, W., Everts, V. : Formation of acellular root cementum in relation to dental and non-dental hard tissues in the rat, J. Dent. Res., 69(10): 1669-1673, 1990.
12. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. : The regeneration potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey, J. Clin. Periodontol., 9(3): 257-265, 1982.
13. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration, J. Clin. Periodontol., 11(8): 494-503, 1984.
14. Nyman, S., Westfelt, E., Sarhed, G., Karring, T. : Role of Diseased root cementum in healing following treatment of periodontal disease. A clinical study, J. Clin. Periodontol., 15(7): 464-468,

- 1988.
15. Nyman, S., Sarhed, G., Ericsson, I., Gottlow, J., Karring, T. : Role of Diseased root cementum in healing following treatment of periodontal disease. An Experimental study in the dog, *J. Periodont. Res.*, 21: 496-503, 1986.
 16. Cho, M.I., Garant, P.R. : Radioautographic study of [³H] Mannose utilization during cementoblast differentiation, formation of acellular cementum, and development of periodontal ligament principal fibers, *Anat. Rec.*, 223: 209-222, 1989.
 17. Melcher, A.H., McCulloch, C.A., Cheong, T., Nemeth, E., Shiga, A. : Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo, *J. Periodont. Res.*, 22(3): 246-247, 1987.
 18. Yamasaki, A., Rose, G.G., Pinero, G.J., Mahan, C.J. : Ultrastructural and Morphometric analysis of human cementoblast and periodontal fibroblasts, *J. Periodontol.*, 58(3): 192-201, 1987.
 19. Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., Wennstrom, J. : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports, *J. Clin. Periodontol.*, 13(6): 604-616, 1986.
 20. Roberts, W.E., Wood, H.B., Chambers, D.W., Burk, D.T. : Vascularly oriented differentiation gradient of osteoblast precursor cells in rat periodontal ligament : Implications for osteoblast histogenesis and periodontal bone loss, *J. Periodont. Res.*, 22(6): 461-467, 1987.
 21. Humerfelt, A., Reitan, K. : Effects of hypercementosis on the movability of teeth during orthodontic treatment, *Angle Orthod.*, 36(3): 179-189, 1966.
 22. Humerfelt, A., Reitan, K. : Hypercementosis, its developmental stage and effects on the movability of teeth during orthodontic treatment, *Rep. Congr. Eur. Orthod. Soc.*, 41: 277-294, 1965.
 23. Hammarström, I., Heijl, L., Gestrelus, S. : Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins, *J. Clin. Periodontol.*, 24: 669-697, 1997.
 24. 오제익, 채중규, 김종관, 조규성, 최성호 : 성견의 1면 골결손부에서 법랑 기질 유도체가 치주조직 치유에 미치는 영향, *대한치주과학회지*, 4:767-783, 1997.
 25. MacNeil, R.L., D'errico, J.A., Ouyang, H., Berry, J., Strayhorn, C., Somerman, M.J. : Isolation of murine cementoblasts: unique cells or uniquely positioned osteoblasts?, *Eur. J. Oral Sci.*, 106(Suppl 1): 350-356, 1998.
 26. Schroder, H. : Biological problem of regenerative cementogenesis ; Synthesis and attachment of collagenous matrices on growing established root surface, *Int. Rev. Cytol.*, 142: 1-9, 1992.

사진부도 설명

- Figure 2-a Elongated PDL fibroblasts were moving to dentin side (PAS & Toluidine blue, $\times 400$)
- Figure 2-b PDL fibroblasts moved to dentin side (PAS & Toluidine blue, $\times 400$)
- Figure 2-c Cementoblasts which were differentiated from PDL fibroblasts produced new cementum(PAS & Toluidine blue, $\times 400$)
- Figure 2-d Some cementocytes were embedded into cementoid (PAS & Toluidine blue, $\times 400$)

사진부도

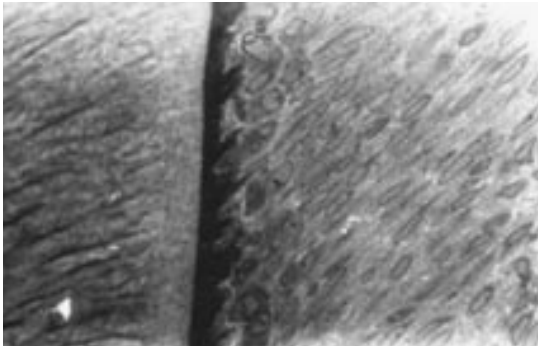


Figure 2-a

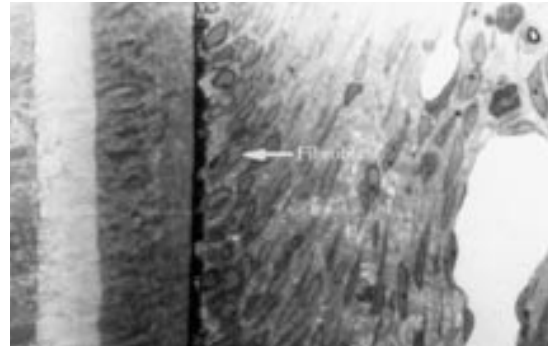


Figure 2-b

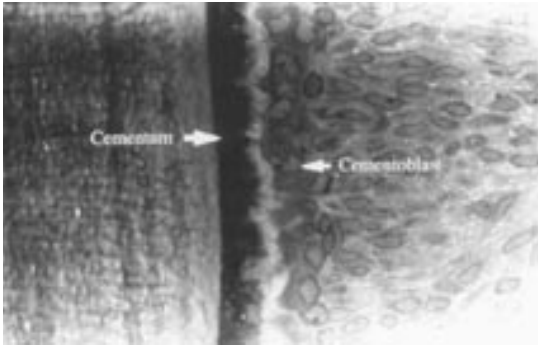


Figure 2-c

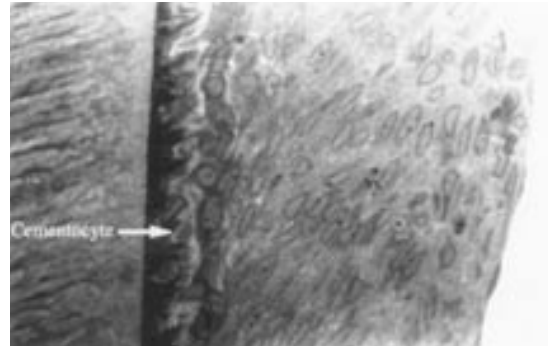


Figure 2-d

Analysis of PDL Fibroblast Change During Mechanical Stimuli in the Rats

Tae-Gyun Kim, Chang-Sung Kim, Kyoo-Sung Cho, Jung-Kiu Chai,
Chong-Kwan Kim, Seong-Ho Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University
Research Institute for Periodontal Regeneration

Periodontal disease is characterized by inflammation and subsequent loss and/or damage to tooth-supporting tissues such as bone, cementum, and periodontal ligament. Periodontal ligament and cementum are the key tissues in the initial process of regeneration following periodontal disease. Therefore, studies on cementoblasts, which form cementum are emphasized.

It is still unclear which cells cementoblast differentiate from. This study was conducted under the hypothesis that PDL fibroblast can differentiate into either cementoblast or osteoblast depending on the conditions of surrounding tissue. Clinically, with excessive traction force of orthodontic appliances or excessive occlusion hypercementosis is observed, and this has been confirmed histologically. Consequently, activation of cementoblast can be expected in rats when mechanical stimuli are given to PDL fibroblast. Therefore, the purpose of this article is to prove that PDL fibroblast differentiates into cementoblast in rats under mechanical stimuli using histologic and molecular methods.

In this study, twenty rats were given hard diet. Ten of them were sacrificed after 1 week, and the others were sacrificed after two weeks. Slides were made from tooth specimen, and they were studied under the microscope. In addition, PDL fibroblast and cementum from the extracted teeth were analyzed with Northern blotting.

In histologic examination, as time passed, PDL fibroblast migrated to the dentin side, differentiated into cementoblast, and formed new cementum. In Northern blotting, it was found that mRNA expression of cementoblast-specific proteins such as BSP, OC, OPN, and type I collagen were more prominent in rats sacrificed after 2 weeks of hard-diet than rats sacrificed after 1 week.

From these findings we can conclude that PDL fibroblast can differentiate into cementoblast under mechanical stimuli. We think that 'Rat Models' used in this study will be beneficial to future studies regarding cementoblast.