

Platelet-derived growth factor-AA, BB가 치주인대세포의 세포활성에 미치는 영향에 대한 연구

경북대학교 치과대학 치주과학교실
오상덕 · 이재목 · 서조영

I. 서 론

치주질환이 진행되면 치주낭의 형성과 하부의 치은결체조직, 백악질, 치조 골 및 치주인대 섬유들의 파괴로 말미암아 치아동요가 증대되고 궁극적으로는 치아의 상실을 초래하게 된다. 그러므로 치주치료의 목적은 교원질 섬유를 포함한 결체조직의 부착과 백악질, 골조직 재형성을 유도할 수 있는 적절한 세포가 시술부위 이주하여 부착과 증식, 분화를 통해서 치주조직의 재생을 도모하는 것이어야 한다¹⁾.

치주치치후 나타나는 치유양상으로는 회복, 재부착, 신부착, 재생 등 네가지로 구분할 수 있다. 회복은 치주낭이 정상적인 치은의 외형과 치은열구의 형태로 치유되거나 치주낭의 기저부의 위치가 향상되지 않아 치근이 노출되는 치유 형태를 말하며, 재부착은 기존에 있던 치주조직이 손상이나 절제되었던 부위가 치근면에 재결합하는 형태이며, 신부착은 기능적으로 배열된 사피스 섬유가 신생백악질과 치조골에 매입되어 형성되는 형태이며, 재생은 치주질환으로 인해 상실된 부착기구들이 신생골, 신생백악질과 함께 새로운 치주인대 섬유가 가능적으로 삽입, 배열되어 재형성된 상태이다²⁻⁴⁾. 그러므로 가장 이상적인 치료 방법은 더 이상의 부착 상실을 예방하는 것은 물론이거니와 치주조직의 재생이라 하겠다.

치조조직의 치유양상에 관여하는 조직으로는 치은상피, 치은결체조직, 치조골과 치주인대가

있으며 이러한 조직으로부터 유래된 세포들이 치유부위의 치유양상을 결정하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 즉, 통상적인 치주치치 후 대부분의 치유양상은 상피세포의 근단 방향으로의 빠른 증식과 이주에 의하여 긴접합상피가 부착됨이 보고되었고⁶⁻¹⁰⁾, 치주질환에 이환된 치근면이 치은결체 조직과 접촉된 후의 치유양상은 치은섬유들이 치근면에 평행하게 배열된 뿐 아니라 치근흡수를 초래하였으며^{11,12)}, 치주질환에 이환된 치아를 발거하여 치근면에 부착된 치주인대조직을 제거한 후 악골과 치조골에 재이식시 치근면 흡수와 골성강직이 야기된다고 보고하였다^{11,13,14)}. 그러므로 Nyman 등^{15,16)}은 치은상피의 치은결체조직을 배제시킨 실험모델에서 치유되는 양상을 살펴 본 결과 치주질환에 이환된 치근면에 교원질 섬유가 삽입된 신생백악질이 형성됨을 관찰하므로써 치주조직의 재생에 치주인대세포가 중요한 역할을 할 것이라고 처음 시사하였다.

치주인대는 결합조직세포, 상피세포, 방어 기전에 작용하는 세포와 신경혈관계에 관여하는 세포들로 구성되어 있다. 그 중 결합조직내에 있는 세포로는 섬유아세포, 조골세포, 백악아세포, 파골세포, 미분화된 증배엽세포들이 존재하며 섬유아세포가 치주인대 전 부피의 약 50%를 차지한다고 알려져 있다^{17,18)}. Gould 등¹⁹⁾, Gould²⁰⁾, McCulloch²¹⁾ 및 Davidson과 McCulloch²²⁾은 생체 치주인대 조직내에 ³H-thymidine을 주입하고 자가방사능법과 전자현미경을

이용하여 관찰한 연구들에서 혈관주변에서 느리게 증식하는 미분화된 전구세포를 관찰할 수 있다고 보고하였고, Aukhil등²³⁾은 치주인대조직에는 상아질과 접촉시 백악아세포로 분화될 수 있는 전구세포가 있다고 주장하였으며, Robert와 Chase²⁴⁾는 교정치료를 치주인대내의 혈관주위세포가 치조골 쪽으로 이주하여 골아세포로 분화되어 신생골을 형성한다고 보고하였다. 이상의 연구들로 미루어 볼 때 치주인대에 결합조직세포종의 하나인 미분화된 중배엽세포들은 혈관주위에 분포하고 있으면서 어떠한 조건이 주어지면 치주인대에 존재하고 있는 모든 결합조직세포로 분화할 수 있는 복합기능을 가진 세포라는 것을 알 수 있다.

현재까지 치주조직재생을 위해 사용된 치료로는 이환된 병소부의 단순제거^{25,26)}, 노출된 치근면을 피개 보호할 목적인 치관변위 판막술²⁷⁾, 약제의 치근면처리법²⁸⁻³³⁾, 불화성 골전도물질 삽입³⁴⁻³⁸⁾, 골유도 혹은 골형성물질 사용³⁹⁻⁴⁰⁾, 치은상피의 근단축 전이방지를 위한 조직유도재생술⁴¹⁻⁴⁵⁾ 등 다양한 방법들이 제시되었으나 거의 치주조직의 재생보다는 회복의 치유양상을 나타내었다⁴⁶⁾. 이 회복은 치은결체조직과 치근면 사이에서 치은상피가 하방으로 이동하는 것이 특징적이며 이 상피의 개재는 치주인대세포가 노출된 치근면에 부착하는 것을 방해하여 치주조직의 재생을 억제한다고 할 수 있다. 치주조직의 재생이 일어나도록 하기 위해서 치주인대내에 있는 미분화된 전구세포들이 노출된 치근면에 이주, 부착, 증식하여 잘 조직화된 치주조직의 부착기구를 형성하며, 마찬가지로 골의 전구세포도 이주, 증식하여 재생된 치주인대와 함께 성숙되어야 한다. 그러므로 지난 10년 동안 세포의 이주, 부착, 증식을 조절하는 성장인자에 대해서 활발한 연구가 이루어지고 있다.

Terranova와 Wikesjö⁴⁷⁾은 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자(Polypeptide Growth Factor, 이하 PGF로 표기)에 의해 조절되며 PGF가 치주조직 재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라고 시사하였다. 수많은 종류의

PGF중 창상치유에 관여하는 성장인자로서 혈소판유래성장인자(Platelet-Derived Growth Factor, 이하 PDGF로 표기), 섬유아세포성장인자(Fibroblast Growth Factor, 이하 FGF로 표기), 변형성장인자(Transforming Growth Factor, 이하 TGF로 표기), 인슐린 유사성장인자(Insulin-like Growth Factor, 이하 IGF로 표기), 상피성장인자(Epidermal Growth Factor, 이하 EGF로 표기), 인터루킨-1(Interleukin-1, 이하 IL-1으로 표기) 등이 있으며⁴⁸⁾, 이중 PDGF는 중배엽의 세포 즉 섬유아세포, 신경세포, 평활근세포, 골세포를 조절하는데 중요하다고 알려져 있다⁴⁹⁻⁵³⁾.

PDGF는 9.8의 isoelectric point와 30kDa의 분자량을 가지고 있는 조절성 단백질로서⁵⁴⁻⁵⁷⁾ 단종이량체(PDGF-AA, BB)와 이종이량체(PDGF-AB)로 존재함이 발견되었으^{58,59)} 유리되는 근원은 혈소판의 α -granule로 알려져 있다⁶⁰⁾. 혈소판 이외에 단핵세포 및 대식세포⁶¹⁾, 섬유아세포⁶²⁾, 내피세포⁶³⁾, 골기질⁶⁴⁾ 등으로부터 분리된다고 밝혀졌다.

생체실험에서의 PDGF에 관한 연구에 대해 살펴보면, Lynch등^{65,66)}은 돼지의 피부 창상부위에 PDGF적용시 적용농도에 따라 신생결체조직과 내피층의 두께가 증가됨을 관찰할 수 있었고, IGF-1과 함께 투여시 PDGF 단독투여보다 더 많은 양의 신생결체조직이 형성됨을 보고하였으며, Pierre등⁶⁷⁾은 PDGF 단독투여시 창상치유에 효과적이었다고 보고하였다.

이런 연구들을 바탕으로 Lynch등^{68,69)}은 동물 실험에서 자연적으로 생긴 치주염에 치주처치의 한 방법으로 PDGF와 IGF-1을 혼합하여 치주수술 후 병소부위에 적용시켜 본 결과 대조군에 비해 현저한 신생백악질과 치조골의 형성을 관찰할 수 있었다고 보고하였으며 연이어 시행한 부가적인 연구⁷⁰⁾에서 PDGF와 IGF-1의 혼합사용이 implant주위의 골재생에도 효과가 있다고 보고하였다. 또한 Rutherford등⁷¹⁾은 원숭이에서 실험적으로 야기된 치주염의 치료방법으로 PDGF와 IGF-1 혼합사용시 백악질, 치주인대등의 재생과 신부착이 일어남을 관찰할 수 있었음을 보고하였다.

최근에는 장과 이⁷²⁾가 동물실험에서 PDGF 단독사용시 잘 분화된 백악아세포에 의해 형성된 신생백악질에 결합조직이 수직으로 배열되었음을 보고하였고, 조동⁷³⁾은 개에서 실험적으로 야기된 치근이개부병변에 PDGF 단독적용시 전체적으로 조직재생의 속도가 빠르고 치유양상도 치주조직 고유형태로 변화진행됨이 관찰되었다고 보고하였다.

시험관적 실험에서는 Canalis⁷⁴⁾에 의하면 배양된 쥐의 두개관 세포에 PDGF 적용시 DNA 합성을 증가시키고 단백질 합성에는 비특이성 자극효과가 있다고 보고하였으며 Rutherford⁷⁵⁾은 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF의 효과를 규명한 실험에서 각 세포의 증식에 유효하다고 보고하였으며, Matsuda⁷⁶⁾은 배양된 쥐의 치주인대세포에 PDGF적용시 세포의 증식, 화학구성, 교원질합성을 증가시킨다고 보고하였고 Oates⁷⁷⁾은 사람의 치주인대 세포에 PDGF주입시 PDGF의 3 isoform 모두 치주인대세포의 증식을 조절하는데 주된 역할을 한다고 주장하였다.

이상의 연구들을 살펴본 결과 국소부위에서 중배엽세포를 조절하는데 중요하다고 알려진 혈소판유래성장인자를 선택하여 배양된 치주인대세포에 농도별로 주입해서 세포의 증식능, 단백질 및 교원질 합성능을 측정해 보고, 골형성세포로의 분화에 대한 표식인자로 알카린인산효소활성도를 알아보므로써 혈소판유래성장인자가 치주조직 재생에 중요한 치주인대세포에 미치는 영향을 규명하고자 본 실험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료(시약)

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium(Gibco사, 미국, 이하 DMEM로 표기)을 사용하였고, fetal bovine serum(Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그의 trypsin, bovine serum albumin(이하 BSA로 표기), ascorbic acid, dimethyl sulfoxide, highly purified bacterial collagenase

type VII, sodium paranitrophenyl-2-phosphate, paranitrophenol, nonident F-40 (이상 Sigma사, 미국)등을 사용하였다. 그리고 [methyl-³H] thymidine(6.7 Ci/mmol)(New England Nuclear사, 미국), L-[5-³H] proline (12.4 Ci/mmol)(New England Nuclear사, 미국), 유전자 재조합형 PDGF-AA, BB(Genzyme사, 미국)를 사용하였다.

2. 치주인대세포의 세포배양

교정치료를 목적으로 경북대학교병원에 내원한 환자의 발거될 제일소구치를 해당부위로 하고 초기배양과정에서 야기될수 있는 세균감염을 예방하고자 통상의 배양액에 포함되는 항생제 용량의 2배인 200U/ml penicillin(근화 제약, 한국)과 200μ/ml streptomycin(동아 제약, 한국)이 첨가된 DMEM을 생검배지로 준비하였다. 조직처리과정에서 치은조직합입을 배제하고 치주인대조직만 채취하기 위하여 제일소구치부위에 내사면 절개를 가하고 치경부 1/3부위를 소파한 후 제일소구치를 발거하여 생검배지에 침수시켰다. 발거한 치아를 생검배지로 3회 세척한 후 치근중간 1/3부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절한 다음 35 mm 배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합배양기(Sanyo사, 일본)에 배양하였다. 치주인대 세포가 조직세면으로 부터 증식되어 단층밀생이 형성된 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였다. 이 실험에서 모든 세포들은 4세대에서 7세대 사이의 세포를 사용하였다.

3. 치주인대세포 증식 및 DNA합성 측정

PDGF-AA, BB가 치주인대세포 증식능에 미치는 영향은 [³H]thymidine이 DNA내로 편재되는 속도로서 관찰하였다. 치주인대세포를 1 × 10⁵ cells/ml이 되게 24 well culture plates에 넣고 3일간 배양하여 육안적인 밀생상태가 되게하였다. 그 후 세포배양액을 제거한 세포층을

phosphate buffered saline(이하 PBS로 표기)으로 2번 씻은 후 1% BSA이 든 DMEM으로 교체하여 이틀간 세포주기를 정지시킨 후 여기에 0.1, 1, 10, 100ng/ml 농도의 PDGF-AA, BB와 1 μ g/ml [³H]thymidine을 첨가한 균을 실험으로 하고 PDGF-AA, BB를 첨가하지 않은 균을 대조군으로 하여 24시간동안 배양하였다.

세포배양액을 제거하고 세포층을 PBS로 씻은 후 5% trichloro-acetic acid(이하 TCA)로 표기를 1ml넣고 4°C에서 20분간 방치한다. 그후 5% TCA로 2회 세척하고 찬 ethanol 1ml를 넣고 씻고 실온에서 건조시킨다. DNA내로 편입되지 않은 방사능을 씻어 내고, 준비된 세포층에 500 μ l의 2% Na₂CP₃가 든 0.1N NaOH를 넣어 세포를 완전히 녹인 후 5ml scintillation cocktail과 섞어 DNA로 편입된 방사능을 β -counter로 측정하였다. 측정된 값은 CPM(counter per minute)으로 표기하였다.

4. 총단백질과 교원질합성능의 측정

치주인대세포를 각각 24 well culture plates (Corning사, 미국)에 한 well당 1 \times 10⁵세포를 접종한 후 10% FBS가 함유된 1ml DMEM에서 밀생상태가 될때까지 3일간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 50 μ g/ml ascorbic acid와 1% BSA이 첨가된 DMEM으로 교환하고 2 μ Ci [³H]-proline과 0.1, 1, 10 그리고 100 ng/ml PDGF-AA, BB를 주입한 균을 실험군으로 하고 PDGF-AA, BB를 주입하지 않은 균을 대조군으로 하여 배양하였다. 24시간이 경과한 후 생성된 총 단백질과 교원질 양을 Peterkofsky와 Diegelmann⁷⁸⁾ 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다.

각 well에 5 \times collagenase buffer(0.25M Tris, 0.025M CaCl₂와 0.0125M N-ethylmaleimide 함유, pH7.4)를 250 μ l를 첨가하고 24 well culture plates를 얼음위에 놓고 30초간 초음파 분쇄기로 세포막을 파괴시킨 후 1ml씩 취하여

microfuge tube에 넣고 50% trichloroacetic acid (이하 TCA로 표기)/5mM proline 300 μ l를 첨가한 후 잘 혼합하여 0°C에서 5분간 방치한 후 1000g에 5분간 원침하여 상층액을 버리고 5% TCA/1mM proline으로 3회 세척한 후 침전물을 0.2N NaOH에 용해시킨 후 1M HEPES buffer(pH7.2)를 첨가하여 중화시킨 후 5 \times collagenase buffer 100 μ l를 첨가하였다.

microfuge tube에 각 용액을 반으로 나누어 넣은 후 교원질 합성량을 측정하기위한 microfuge tube에 15U collagenase가 함유된 collagenase buffer를 15 μ l 주입하고 총 단백질 합성량을 측정하기 위한 microfuge tube에는 15U collagenase가 함유되지 않은 collagenase buffer를 15 μ l 주입하여 37°C에서 90분간 배양한 다음 collagenase활성을 정지시키기 위해 0°C로 냉각시키고 각 tube에 50% TCA/2.5% tannic acid를 첨가하여 4°C에서 30분간 방치하였다.

교원질 합성량을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유된 microfuge tube를 1000 \times g에서 5분간 원침 후 상층액과 5% TCA/1mM proline으로 세척한 세척액을 counting vial에 담아 10ml scintillation cocktail을 넣어 liquid scintillation counter(Packard사, 미국)로 5분간 방사능을 측정하였다.

총 단백질량을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유되지 않은 microfuge tube를 1000 \times g에서 5분간 원침 후 상층액을 버리고 5% TCA/1mM proline으로 세척 후 침전물을 0.2N NaOH용액으로 용해시켜 counting vial에 담아 상기의 방법으로 방사능을 측정하였다. 단백질 합성에 대한 교합질합성의 상대적 비율은 다음의 공식에 의거하여 계산하였다⁷⁹⁾.

비 교원성 단백질량은 총 단백질 양에서 교원질량을 공제하므로써 산출하였다.

5. 알카리인산효소 활성도 측정

치주인대세포를 각각 24 well culture plates

$$\text{percent of collagen} = \frac{\text{dpm in collagen} \times 100}{(\text{dpm in noncollagenous protein}) \times 5.4 + \text{dpm in collagen}}$$

* dpm : disintegration per minute

(Corning사, 미국)에 한 well당 1×10^5 세포를 접종한 후 10% FBS가 함유된 1ml DMEM에서 7, 14일간 배양하였다. 각각 배양일 마지막 3일전에 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 1% BSA이 첨가된 DMEM으로 교환하여 10, 100ng/ml PDGF-AA, BB를 주입한 군을 실험군으로 하고 PDGF-AA, BB를 주입하지 않은 군을 대조군으로 하여 배양하였다.

세포층의 알카린인산효소활성도는 Bessay 등⁸⁰⁾ 및 Brunch와 Levovitz⁸¹⁾의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 조건을 준 24 well culture plates의 배양액을 제거하고 찬 PBS로 3번 씻은후 측정할때 까지 -70°C 에서 보관하였다. 얼음위에서 기질(PNPP : sodium sodium parantitophenyl-2-phosphate)을 준비하고 세포층에 lysis완충액(0.02% Nonident F-40)을 1ml 넣어 30초간 초음파 마쇄기로 마쇄한 다음 300 μl 를 취하여 알카린인산효소 활성도를 측정하고 200 μl 를 취하여 Lowry 등⁸²⁾의 방법으로 단백질 양을 측정하였다. 표준용액으로는 paranitrophenol을 30nmol까지 되도록하여 넣고 37°C 에서 30분간 반응시킨뒤 1 N NaOH 250 μl 를 넣어 반응을 중단시켰다. 이것을 410nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여, 알카린인산효소 활성도를 nM/30min/mg protein단위로 나타내었다.

III. 성 적

1. DNA 합성능에 미치는 PDGF-AA, BB의 효과

치주인대세포의 DNA 합성능에 미치는 PDGF-AA, BB의 효과는 PDGF-AA를 투여한 군에서는 0.1ng/ml를 제외하고는 DNA 합성능이 증가하는 경향을 보였고, 대조군에 비해 1, 100ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이 ($P < 0.01$)를 나타내었다(Fig. 1참조).

PDGF-BB를 투여한 군에서는 10ng/ml까지 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가하였으나 100ng/ml는 $16.6 \pm 1.0 \text{ CPM} \times 10^3/\text{Well}$ 로 대조군의 $17.7 \pm 1.0 \text{ CPM} \times 10^3/\text{Well}$ 에 비하여 미약하나마 감소하는 경향을 나타내었고,

대조군에 비해 10ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이 ($P < 0.001$)를 나타내었다(Fig. 2참조).

2. 총단백질 합성양과 교원질 합성능에 미치는 PDGF-AA, BB의 효과

치주인대세포의 총단백질 합성양에 미치는 PDGF-AA, BB의 효과는 PDGF-AA, BB 투여군

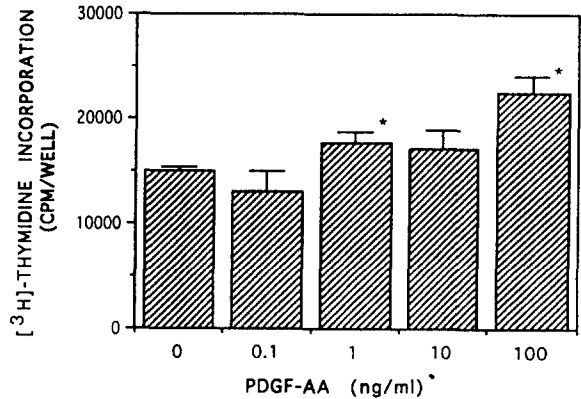


Fig 1. Dose-dependent effect of platelet-derived growth factor-AA on DNA synthesis by periodontal ligament cells in the presence of 1% bovine serum albumin. 24 well culture plates were seeded with 1×10^5 cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After incubation for 3 days, the medium replaced with Dulbecco's modified Eagle medium supplement with 1% bovine serum albumin as described in materials and methods. Platelet-derived growth factor-AA were added to the quiescent cells were labeled with $1 \mu\text{Ci} [^3\text{H}]$ thymidine for the last 24h of culture. The values are expressed as mean and S. D. of four determinations.

* : Significantly different from control value ($P < 0.001$)

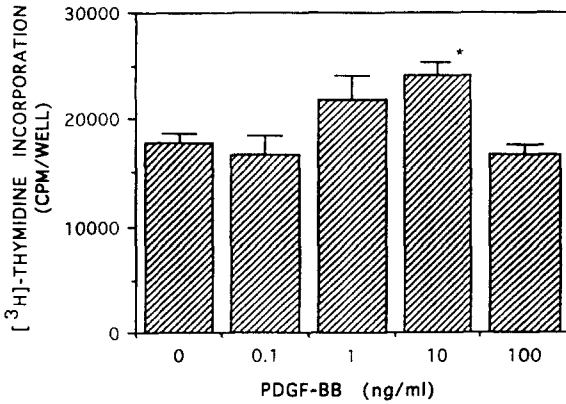


Fig 2. Dose-dependent effect of platelet-derived growth factor-BB on DNA synthesis by periodontal ligament cells in the presence of 1% bovine serum albumin. 24 well culture plates were seeded with 1×10^5 cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After incubation for 3 days, the medium replaced with Dulbecco's modified Eagle medium supplement with 1% bovine serum albumin as described in materials and methods. Platelet-derived growth factor-BB were added to the quiescent cells were labeled with $1\mu\text{Ci}[^3\text{H}]$ thymidine for the last 24h of culture. The values are expressed as mean and S. D. of four determinations.

* : Significantly different from control value ($P < 0.001$)

공히 농도가 증가함에 따라 총단백질 합성양이 증가하는 경향을 보였다(Table 1, 2).

총단백질을 교원질(collagenase digestible protein : CDP)과 비교원성 단백질(noncollagenous protein : NCP)로 분류하여 비교하였을 때 PDGF-AA, BB투여군 공히 농도가 증가함에 따라 비교원성 단백질 합성양과 교원질 합성양이 증가하는 경향을 보였으며(Fig. 3, 4

참조), 양군 공히 대조군에 비해 10, 100ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이($P < 0.001$)를 나타내었다.

총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 양군 공히 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3, 4참조). PDGF-BB를 투여한 군에서 대조군에 비해 10, 100ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이($P < 0.001$)를 나타내었다. 그러므로 PDGF-AA, BB는 교원질에만 특이하게 합성을 증가시키는 효과는 없음을 나타내었다.

3. 알카린인산효소활성도에 미치는 PDGF-AA, BB의 효과

치주인대세포의 알카린인산효소활성도에 미치는 PDGF-AA, BB의 효과는 모든 군에서 7째보다 14일째에서 높은 알카린인산효소활성도를 나타내었으나 대조군에서 비해 PDGF-AA, BB 투여군 모두 별 차이를 보이지 않았다(Fig. 5 참조). 그러므로 PDGF-AA, BB는 치주인대세포의 알카린인산효소활동에 별 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

IV. 고 찰

Nister등⁸³⁾과 Kazlauskus등⁸⁴⁾은 PDGF-BB, AB는 동등한 활성도를 가지고 있으며 사람의 섬유아세포에서 DNA 합성을 자극하는 동일한 강도를 가지고 있으나 PDGF-AA는 세포유사분열에 대한 활성도가 다른 두 개의 isoform과 비교시 약하게 나타난다고 보고하였다. Ramakrishnan과 Cho⁸⁵⁾는 쥐의 치주인대세포에 대한 PDGF의 수용기를 동정해낸 실험에서 쥐의 치주인대세포에는 세포의 화학주성과 증식에 중요한 역할을 하는 β 형태의 PDGF 수용기가 존재함을 보고하였고, Oates등⁷⁾은 사람의 치주인대세포에 PDGF-AA, BB를 주입해서 세포의 증식을 알아본 실험에서 PDGF-AA, BB 모두 DNA 합성을 증가시킴을 보이므로써 사람의 치주인대세포에는 α 와 β 수용기가 존재할 것이라고 시사하였다. 그러므로 이상의 연구들을 근거로 하여 PDGF-AA, BB를 본 실험의 연구

Table 1. Dose-response effect of platelet-derived growth factor-AA on total protein synthesis by human periodontal ligament cells in the presence of 1% bovine serum albumin.

Conc.(ng/ml)	Total Protein (dpm×10 ³ /well)
0	32.9± 4.4
0.0	33.0± 3.4
1	36.1± 3.3
10	54.7± 1.3*
100	59.2± 2.1*

Cells were seeded at 1×10^5 cells/ml in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbecco's modified Eagle medium containing 1% bovine serum albumin, 50µg/ml ascorbic acid and $2\mu\text{Ci} [^3\text{H}]$ proline and the indicated amounts of platelet-derived growth factor-AA were added. Total protein synthesis were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S. D. of four determinations.

* : Significantly different from control value ($P < 0.001$)

Table 2. Dose-response effect of platelet-derived growth factor-BB on total protein synthesis by human periodontal ligament cells in the presence of 1% bovine serum albumin.

Conc.(ng/ml)	Total Protein (dpm×10 ³ /well)
0	31.6± 3.9
0.1	30.7± 1.5
1	35.6± 3.3
10	69.5± 4.6*
100	91.1± 5.9*

Cells were seeded at 1×10^5 cells/ml in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbecco's modified Eagle medium containing 1% bovine serum albumin, 50µg/ml ascorbic acid and $2\mu\text{Ci} [^3\text{H}]$ proline and the indicated amounts of platelet-derived growth factor-BB were added. Total protein synthesis were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S. D. of four determinations.

* : Significantly different from control value ($P < 0.001$)

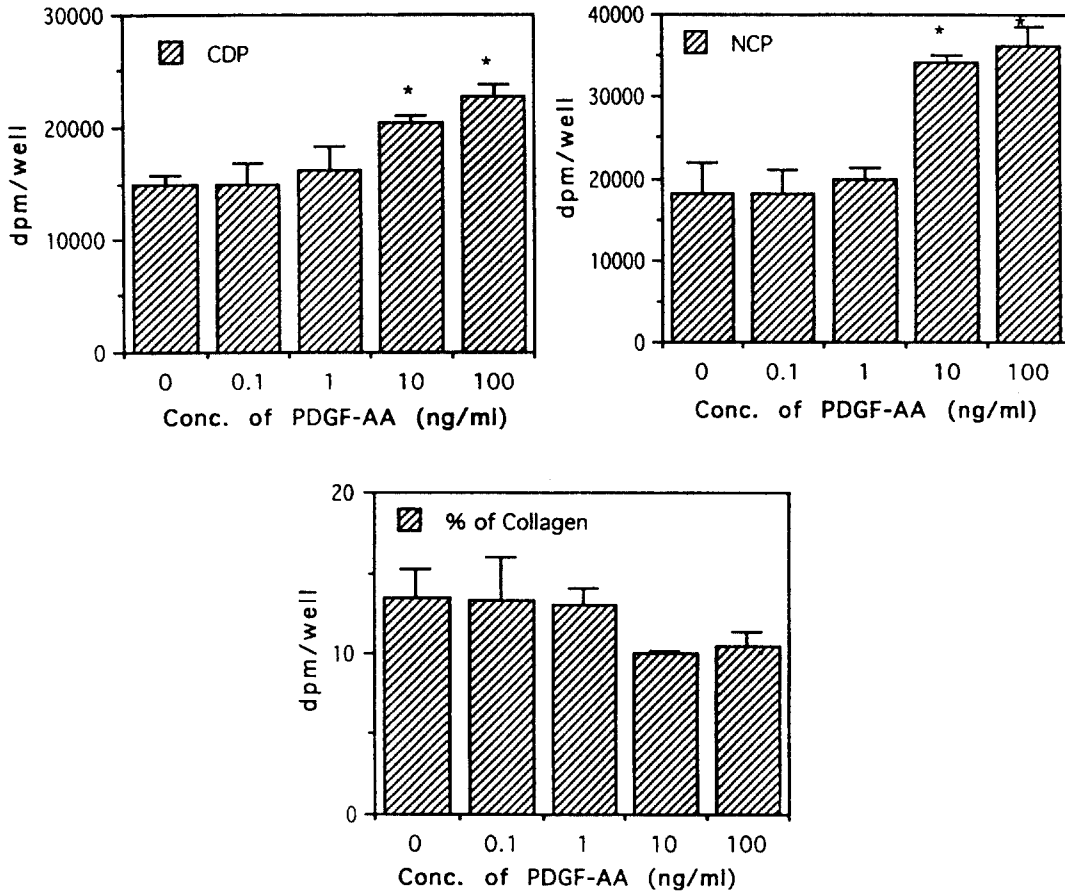


Fig 3. Dose-response of platelet-derived growth factor-AA on collagenous and non-collagenous protein synthesis by periodontal ligament cells. Confluent cultures containing 2 μ Ci/ml of [3 H] proline and 50 μ g/ml of ascorbic acid in the medium were unstimulated or treated with 0, 0.1, 1, 10, 100ng/ml of platelet-derived growth factor-AA for 24h, % of collagen is the percentage of newly synthesized collagen relative to total protein. The values are expressed as mean and S.D. of four determinations.

* : Significantly different from control value(P<0.001)

NCP : Noncollagenous protein

CDP : Collagenase digestible protein

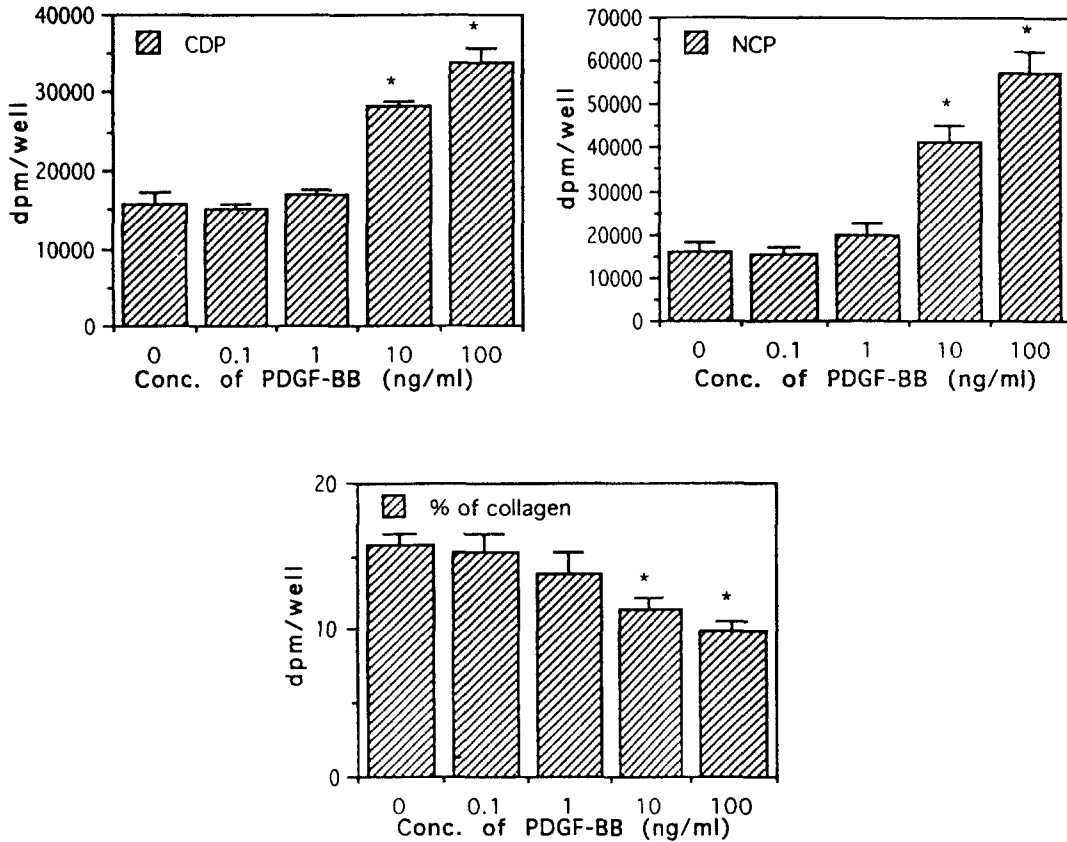


Fig 4. Dose-response of platelet-derived growth factor-BB on collagenous and non-collagenous protein synthesis by periodontal ligament cells. Confluent cultures containing $2\mu\text{Ci/ml}$ of $[^3\text{H}]$ proline and $50\mu\text{g/ml}$ of ascorbic acid in the medium were unstimulated or treated with 0, 0.1, 1, 10, 100ng/ml of platelet-derived growth factor-AA for 24h, % of collagen is the percentage of newly synthesized collagen relative to total protein. The values are expressed as mean and S. D. of four determinations.

* : Significantly different from control value($P < 0.001$)

NCP : Noncollagenous protein

CDP : Collagenase digestible protein

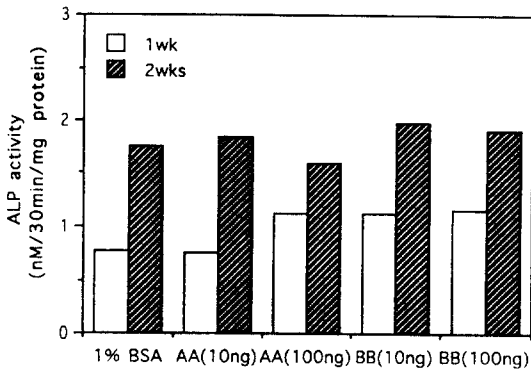


Fig 5. The effect of platelet-derived growth factor-AA, BB on alkaline phosphatase activity by human periodontal ligament cells in the presence of 1% bovine serum albumin. Alkaline phosphatase activity was measured as materials & methods. Result expressed in terms of nM/min/mg protein, mean of three determinations.

재료로 사용하였다.

PDGF의 세포증식에 관한 연구에 대해 살펴 보면 Canalis⁷⁴⁾은 쥐의 두개관조직배양에 0.2, 0.6, 2, 6, 20, 60, 200ng/ml의 PDGF를 투여하여 DNA합성을 측정해 본 결과 0.6~200ng/ml의 농도에서 대조군에 비해 DNA 합성이 증가하였으며 60ng/ml 보다 200ng/ml 투여군에서 약간 감소하는 경향을 보인다고 보고하고, Canalis^{등⁸⁶⁾}은 쥐의 두개관을 조직배양하여 0, 1, 10, 100ng/ml의 PDGF-BB 투여시 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가됨을 보고하였다. Matsuda^{등⁷⁶⁾}은 쥐의 치주인대세포를 이용한 연구에서 0.1, 1, 10ng/ml의 PDGF-BB, AB를 투여해 본 결과 농도가 증가할수록 DNA 합성능이 증가하였으며 0.1ng/ml 투여시 보다 10ng/ml 투여시 3배 정도 증가하였음을 보고하였다. Oates^{등⁷⁷⁾}은 사람의 치주인대세포에 0, 0.1, 1, 5, 10, 20, 50ng/ml의 PDGF-AA, BB를 투여해 본 결과 농도가 증가함에 따라 양군 공히 DNA 합성능이 증가함을 보고하였다. 국내 연

구로서 정등⁸⁷⁾은 치주인대세포에 PDGF-BB 투여시 세포의 증식을 촉진시키며 그 효과는 20 ng/ml일 때 최고의 효과를 보인다고 보고하였다.

이 연구에서 PDGF-AA, BB가 세포증식에 미치는 영향을 DNA 합성능을 측정해 보므로써 알아본 결과 PDGF-AA를 투여한 군에서는 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가하는 경향을 보였으며 대조군에 비해 1, 100ng/ml 투여군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. PDGF-BB를 투여한 군에서는 10ng/ml 까지 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가하였으나 100ng/ml에서는 대조군에 비해 미약하나 감소하는 경향을 나타내었고, 10ng/ml 투여한 군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다. 이는 PDGF의 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능도 증가한다고 보고한 Canalis⁷⁵⁾, Canalis^{등⁸⁶⁾}, Matsuda^{등⁷⁶⁾}, Oates^{등⁷⁷⁾}의 연구결과와 유사하였다. 그러나 DNA의 합성능은 Matsuda^{등⁷⁶⁾}과 Oates^{등⁷⁷⁾}의 연구에서 보고한 양 보다 본 실험에서 낮게 나타났는데 그 이유로는 실험방법의 차이로 여겨지는 바, Matsuda^{등⁷⁶⁾}은 각 well당 2×10^4 개의 세포를, Oates^{등⁷⁷⁾}은 2.5×10^4 의 세포를 접종하였고 이 연구에서는 1×10^5 개의 세포를 접종하므로써 다른 연구와 비교시 더욱 밀생한 상태에서 세포를 배양하므로써 세포상호간의 활성화에 영향을 미쳤기 때문이라고 생각된다. 또한 PDGF가 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해서 조건을 준 배양액에 통상 세포배양시 첨가되는 10% FBS를 배제하고 Matsuda^{등⁷⁶⁾}은 1% FBS를, Oates^{등⁷⁷⁾}은 0.1% FBS를, 이 연구에서는 1% BSA를 각각 첨가한 것도 상이한 점이라 하겠다.

치주조직의 결합조직은 교원질, 비교원성 단백질, glycosaminoglycans와 소량의 elastin으로 구성되어 있다. 그 중에서 교원질이 주성분을 이루며 치은에서 교원질은 전체 조직을 구성하는 단백질의 약 60%를 차지하고 있다. 치주조직에 존재하는 교원질의 형태는 치은에서는 type I과 type III가 99%를 구성하고 type IV가 1% 이하로 존재하며, 치주인대에서는

type I는 94%, type III는 16-18%, type V는 1%를 나타내고, 백악질에서는 type I이 95%, type II는 5% 이하이고, 치즈골에서는 type I만 나타난다⁸⁸⁾. 그러므로 결체조직의 구성 성분 특히 교원질의 합성은 질환에 이환된 부위의 치유과정 및 조직의 구조와 기능을 유지하는데 있어서 중요하다. 한편 교원질에는 proline과 hydroxyproline 같은 amino acid가 존재하는데 이들은 구조적으로 안정하며 다른 단백질(4.1%)에 비해 교원질(22.2%)내에 특이하게 많은 비율을 차지하고 있어 proline⁸⁹⁾을 교원질합성을 측정하는데 사용하였다.

PDGF의 교원질합성능에 관한 연구에 대해 살펴보면 Canalis⁷⁴⁾가 쥐의 두개 관조직배양에 0.6, 6, 60, 600ng/ml PDGF 투여시 60ng/ml까지는 교원질과 비교원성 단백질의 합성이 증가하는 경향을 보였으며 200ng/ml 투여군에서는 교원질과 비교원성 단백질의 합성능이 대조군과 유사한 경향을 나타내었다고 보고하였으며, Canalis⁶⁶⁾은 쥐의 두개관조직배양에 0, 1, 10, 100ng/ml의 PDGF-BB를 투여시 교원질 및 비교원성 단백질이 증가하는 경향을 보였으며 비교원성 단백질의 합성이 교원질 합성보다 높게 나타났으며 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. Matsuda⁷⁶⁾은 쥐의 치주인대세포에 PDGF-AB 투여시 대조군과의 비교시 총 단백질양에는 변화가 없었으나 교원질 합성은 약간 증가되었다고 보고하였다.

이 연구에서 PDGF-AA, BB가 총단백질, 교원질, 비교원성 단백질의 합성능에 미치는 영향을 알아본 실험의 결과는 PDGF-AA, BB 투여군 공히 농도가 증가함에 따라 총단백질, 비교원성 단백질, 교원질의 합성이 증가하는 경향을 보였으며 대조군에 비해 10, 100ng/ml 투여군에서 통계학적으로 유의성을 나타내었다. 또한 양군 모두 비교원성 단백질 합성량이 교원질 합성량보다 높게 나타났으며 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내므로써 이는 Canalis⁶⁶⁾의 실험결과와 거의 일치하였다. 비교원성 단백질의 합성이 교원질의 합성보다 높게

나타났으며 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율이 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내므로써 PDGF는 치주인대세포의 교원질 합성능을 특이하게 증가시키지는 않는다고 사료된다.

알카린인산효소는 칼슘과 인 대사에서 관여하는 효소로서 정확한 기능은 알려져있지 않지만 Robinson⁹⁰⁾은 유기인산 기질에서 무기인산을 분리해 낼수 있는 효소라고 보고하였으며, Siffert⁹¹⁾는 골형성 이전의 세포대사와 칼슘과 인 이온이 결정화되기 이전의 골기질 형성에 주로 관여한다고 보고하였고, Stein⁹²⁾은 골세포의 표식인자로서 알카린인산효소활성화를 측정해 보아야 하며 높은 알카린인산효소활성도는 골세포 분화의 표식인자라고 보고하였다.

이 연구에서는 거의 치주인대세포를 배양하여 알카린인산효소활성도를 알아보기 위하여 5, 14일째 조직화학적 염색을 해 본 결과 5일째는 미약한 활성도를 나타내었으나 14일째 강한 알카린인산효소활성도를 나타내었다는 Nojima⁹³⁾과 시간이 경과함에 따라 치주인대세포의 알카린인산효소활성도가 현저히 증가한다는 서⁹⁴⁾의 연구를 근거로 하여 치주인대세포를 7, 14일 동안 배양하여 알카린인산효소활성도를 측정하였다. PDGF-AA, BB가 알카린인산 효소활성도에 미치는 효과를 알아 본 실험의 결과는 모든 군에서 7일째 보다 14일째에서 높은 알카린인산효소활성도를 나타내었으나 대조군에 비해 PDGF-AA, BB 투여군 모두 별 다른 차이를 보이지 않았다. 이는 치주인대세포의 알카린인산효소활성도는 시간이 경과함에 따라 증가했다는 Nojima⁹³⁾과 서⁹⁴⁾의 연구와 일치하며 PDGF-AA, BB는 알카린인산효소활성도에는 별 영향을 나타내지 않는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 미루어 보면 PDGF-AA, BB 모두 농도가 증가함에 따라 치주 인대세포의 증식, 총 단백질, 교원질 및 비교원성 단백질의 합성을 증가시키며 총 단백질에 대한 교원질 합성의 상대적 비율은 감소시키므로써 교원질에만 특이하게 합성을 증가시키지는 않을 것으로 생각되며 총단백질, 교원질, 비교원성

단백질 합성은 세포수의 증가에 기인하여 나타났을 것으로 여겨진다. 또한 이 실험에서 주어진 여건하에서는 PDGF가 치주인대세포의 알칼린인산효소활성도에는 별 다른 영향을 미치지 않으므로써 골 석회화과정에 크게 관여하지 않을 것으로 생각된다. 그러므로 이 연구로 미루어 볼때 PDGF가 치주조직재생에 관여하는 기전으로는 세포수를 증식시킴에 의한 것으로 여겨지며 따라서 IGF-I과 같은 다른 성장인자와의 상호작용에 대한 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다. 또한 세포막에는 PDGF에 대한 2가지 종류의 수용기(α , β 형태)가 있으며, PDEGF-AA는 α 형태의 수용기에만 부착하나 PDGF-BB는 α , β 두가지 형태의 수용기에 다 부착하므로써 세포의 활성을 나타낸다고 보고한 William⁹⁵⁾의 연구를 근거로 해 볼때 이 연구의 결과로는 치주인대세포에는 α , β 형태의 수용기가 존재할 수 있다고 생각되며 이점에 대해서는 이전의 연구들에서 살펴본 바와 같이 아직 논란의 대상이 되므로 더욱 구체적인 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

V. 요약

치주조직의 재생을 위하여 다양한 방법이 제시되어 왔으나 최근에는 치주인대세포를 선택적으로 유도하여 증식시키는 방법으로 성장인자에 대한 연구가 진행되고 있다. 증배엽세포를 조절하는 인자 중의 하나인 혈소판유래 성장인자(Platelet-Derived Growth Factor, 이하 PDGF-AA, BB로 표기)는 폴리펩타이드계 성장인자로써 다양한 세포들에 대해 증식, 이주 및 기질합성에 촉진효과가 있다고 보고된 바 있다.

본 연구는 배양된 치주인대세포에 혈소판유래 성장인자를 농도별로 주입해서 세포의 증식능, 단백질 및 교원질 합성능을 측정해 보고, 골형성세포로의 분화에 대한 표식인자로 알칼린인산효소활성도를 알아보므로써 혈소판유래 성장인자가 치주인대세포에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

교정치료를 위해 내원한 환자로 부터 건강한

제일소구치를 발거하여 치주인대세포를 분리, 배양하여 PDGF-AA, BB를 주입시키지 않은 군을 대조군으로 하고, PDGF-AA, BB를 각각 0.1, 1, 10, 100ng/ml로 주입시킨 군을 실험군으로하여 DNA 합성능, 총단백질과 교원질 합성능 및 알칼린인산효소활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

DNA 합성능에 미치는 PDGF-AA, BB의 효과는 양군 공히 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으나 100ng/ml의 PDGF-BB를 투여한 군에서는 대조군과 유사한 정도를 나타내었다.

치주인대세포의 총단백질 합성양에 미치는 PDGF-AA, BB의 효과는 PDGF-AA, BB투여군 공히 농도가 증가함에 따라 총단백질 합성양이 증가하는 경향을 보였으며, 총단백질 합성양에 대한 PDGF-BB의 효과가 PDGF-AA보다 100 ng/ml 투여군에서 현저히 높게 나타났다.

총단백질을 교원질(collagenase digestible protein : CDP)과 비교원성 단백질(noncollagenous protein : NCP)로 분류하여 비교하였을때 PDGF-AA, BB 투여군 공히 농도가 증가함에 따라 비교원성 단백질 합성양과 교원질 합성양이 증가하는 경향을 보였으며, 양군 모두에서 비교원성 단백질 합성양이 교원질 합성양보다 높게 나타났다. 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율은 양군 공히 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내므로써 PDGF-AA, BB는 교원질에 특이하게 합성을 증가시키는 효과는 없음을 나타내었다.

알칼린인산효소활성도는 7, 14일째에서 PDGF-AA, BB 투여군 모두 대조군과 별 차이를 보이지 않았다.

참고문헌

1. 박준봉 외 17인 : 치주과학 지영문화사, 1992, pp6~59.
2. 박준봉 외 17인 : 치주과학 지영문화사, 1992, pp473~476.
3. Lindhe, J. : Textbook of Clinical Periodontology, 2nd ed., Munksgrard, Copenha-

- gen(1989), p450.
4. The American Academy of Periodontology : Proceedings of the world workshop in clinical periodontics, V-20, 1989.
 5. Melcher, A. H. : On the repair potential of periodontal tissues, *J. Periodontol.* 47 : 256~60, 1976.
 6. Yukna, R. A. : A clinical & histologic study of healing following the excisional new attachment procedure in rhesus monkeys, *J. Periodontol.*, 47 : 701~709, 1976.
 7. Stahh, S. S. : Repair potential of the soft tissue-root interface, *J. Periodontol.*, 48 : 545~552, 1977.
 8. Caton, J. and Nyman, S. : Histometric evaluation of periodontal surgery. : I. the modified widman flap procedure, *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 212~223, 1980.
 9. Caton, J., Nyman, S. and Zander, H. : Histometric evaluation of periodontal surgery. : II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures, *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 224~231, 1980.
 10. Polson, A. M. : The root surface and regeneration : Present therapeutic limitations and future biologic potentials, *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 995~999, 1986.
 11. Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Platen, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue, *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 394~401, 1980.
 12. Karring, T., Nyman, S., Lindhe, J. and Sirirat, M. : P%otentials for root resorption during periodontal wound healing, *J. Clin. Periodontol.*, 11 : 41~52, 1984.
 13. Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into bone tissue, *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 96~105, 1980.
 14. Andreasen, J. O. : Periodontal healing after replantation and autotransplantation of permanent incisors, *Int. J. Oral Surg.*, 60 : 54~61, 1981.
 15. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament : An experimental study in the monkey, *J. Clin. PEriodontol.*, 9 : 257~265, 1982.
 16. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 290~296, 1982.
 17. Beertsen, W. and Everts, V. : The site of remodelling of collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor, *Anat. Rec.*, 189 : 479~498, 1977.
 18. Shore, R. C. and Berkovitz, B. K. B. : An ultrastructural study of periodontal ligament fibroblasts in relation to their possible role in tooth eruption and intracellular collagen degradation in the rat, *Archs. Oral Biol.*, 24 : 155~164, 1979.
 19. Gould, T. R. L., Melcher, A. H. and Brunette, D. M. : Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding, *J. Periodont. Res.*, 15 : 20~42, 1980.
 20. Gould, T. R. L. : Ultrastructural characteristics of progenitor cell populations in the periodontal ligament, *J. Dent. Res.*, 62 : 873~876, 1983.
 21. McCulloch, C. A. G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice, *Anat. Rec.*, 211 : 258~262, 1985.
 22. Davidson, L. and McCulloch, C. A. G. : Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations, *J. Periodont. Res.*, 21 : 414~428, 1986.
 23. Aukhil, I., Simpson, D. M., Suggs, C. and Petterson, E. : In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal liga-

- ment. : An experimental study using physical barriers, *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 862~868, 1986.
24. Roberts, W. E. and Chase, D. C. : Kinetics of proliferation and migration associated with orthodontically-induced osteogenesis, *J. Dent. Res.*, 60 : 174~181, 1981.
 25. Orban, B. : Surgical gingivectomy, *J. Am. Dent. Assoc.*, 32 : 701~703, 1945.
 26. Prichard, J. : Gingivoplasty, gingivectomy and osseous surgery, *J. Periodontol.*, 32 : 275~282, 1961.
 27. Klinge, D., Nilveus, R. and Egelberg, J. : Effects of crown attached sutures on healing of experimental furcation defects in dogs, *J. Clin. Periodontol.*, 12 : 369~373, 1985.
 28. Garrett, J. S., Crigger, M. and Egelberg, J. : Effect of citric acid on diseased root surface, *J. Periodont. Res.*, 13 : 155~163, 1978.
 29. Isidor, F., Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J. : New attachment formation on citric acid treated roots, *J. Periodont. Res.*, 20 : 421~430, 1985.
 30. Nilveus, R. and Egelberg, J. : The effect of topical citric acid application of the healing of experimental furcation defects in dogs. III. The relative importance of coagulum support, flap design and systemic antibiotics, *J. Periodont. Res.*, 15 : 551~560, 1980.
 31. Renvert S. and Egelberg, J. : Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid conditioning of the root surface, *J. Clin. Periodontol.*, 8 : 459~473, 1981.
 32. Renvert, S., Garrett, S., Schallhorn, R. and Egelberg, J. : Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. III. Effect of osseous grafting and citric acid conditioning, *J. Clin. Periodontol.*, 12 : 441~455, 1985.
 33. Wikesjö, U. M. E., Claffey, N., Nilveus, R. E. and Egelberg, J. : Periodontal repair in dogs. : Effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption, *J. Periodontol.*, 62 : 180~184, 1991.
 34. 박준봉, 이만섭 : Bioceramic 제제가 성견 치조골 결손부 재생에 관한 실험적 연구, *대한치주과학회지*, 15 : 45~64, 1985.
 35. 박준봉, 서조영, 김해동 : 배양 치주인대 세포의 성장에 미치는 골대체물의 영향, *대한치주과학회지*, 22 : 484~498, 1992.
 36. Gatti, A. M., Zaffe, D. and Poli, G. P. : Behavior of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects, *Biomat.*, 11 : 513~517, 1990.
 37. Jarcho, M. : Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clin. Ortho. Rel. Res.*, 157 : 259~278, 1981.
 38. Shetty, V. and Han, T. J. : Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery, *DCNA*, 35 : 521~530, 1991.
 39. Terranova, V. P., Franzett, L., Hic, S. and Wikesjö, U. M. E. : Biochemical mediated periodontal regeneration, *J. Periodont. Res.*, 22 : 248~251, 1987.
 40. Terranova, V. P., Hic, S., Franzett, L., Lyall, R. M. and Wikesjö, U. M. E. : A biochemical approach to periodontal regeneration, *AFSCM : Assay for specific cell migration*, *J. Periodontol.*, 58 : 247~259, 1987.
 41. 손희용, 조무현, 박광범, 서조영, 박준봉 : Polytetrafluoroethylene membrane이 성견 치주조직 재생에 미치는 영향, *대한치주과학회지*, 22 : 96~111, 1992.
 42. Blumenthal, N. M. : The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs, *J. Periodontol.*, 59 : 830~836, 1988.
 43. Caffesse, R. G., Nasjleti, C. E., Anderson,

- G. B., Lopatin, D. E., Smith, B. A. and Morrison, E. C. : Periodontal healing following guided tissue regeneration with citric acid and fibronectin application, *J. periodontol.*, 62 : 21~29, 1991.
44. Caffesse, R. G., Smith, B. A., Castelli, W. A. and Nasjletic, C. E. : New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs, *J. Periodontol.*, 59 : 589~594, 1988.
 45. Pontariero, R., Nyman, S., Ericsson, I. and Lindhe, J. : Guided tissue regeneration in surgically-produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog, *J. Clin. Periodontol.*, 19 : 159~163, 1992.
 46. Listgarten M. A. and Rosenberg, M. M. : Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions, *J. Periodontol.*, 50 : 333~344, 1979.
 47. Terranova, V. P. and Wikesjö, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium, *J. Periodontol.*, 58 : 371~380, 1987.
 48. Graves, D. T. and Cochran, D. L. : Mesenchymal cell growth factors, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1 : 17~36, 1990.
 49. Antoniades, H. N. and Owen, A. J. : Growth factors and regulation of cell growth, *Annu. Rev. Med.*, 33 : 445~463, 1982.
 50. Hintz, R. L. and Liu, J. : Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45 : 988~995, 1977.
 51. Ross, R., Raines, E. W. and Bowen-Popo, F. : The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 46 : 155~169, 1986.
 52. Stiles, C. D. : The molecular biology of platelet-derived growth factor, *Cell*, 33 : 653~659, 1983.
 53. Kohler, N. and Lipton, A. : Platelets as a source of fibroblast growth promoting activity, *Exp. Cell Res.*, 87 : 297~301, 1974.
 54. Antoniades, H. N. : Human platelet-derived growth factor(PDGF) : Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 7314~7317, 1981.
 55. Deuel, T. F., Huang, J. S., Proffitt, R. I., Baenzinger, J. U., Chang, D. and Kennedy, B. B. : Human platelet-derived growth factor purification and resolution into two active protein fractions, *J. Biol. Chem.*, 256 : 8896~8899, 1981.
 56. Heldin, C. H., Backstrom, G. and Ostman, A. : Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts evidence for two separate receptor types, *EMBO J.*, 7 : 1387~1393, 1988.
 57. Raines, E. W. and Ross, R. : Platelet-derived growth factor I. High yield purification and evidence for multiple forms, *J. Biol. Chem.*, 257 : 5154~5160, 1982.
 58. Antoniades, H. N. and Hunkapiller, M. W. : Human platelet-derived growth factor (PDGF) : amino terminal amino acid sequence, *Science*, 220 : 963~965, 1983.
 59. Hammacher, A., Hellman, U. and Johnson, A. : A major part of PDGF purified from human platelet is a heterodimer of one A and one B chain, *J. Biol. Chem.*, 263 : 16493~16498, 1988.
 60. Hawiger, J. : Platelet secretory pathway : An overview, *Method, Enzyme.*, 169 : 191~195, 1989.
 61. Rapploee, D. A., Mark, D. and Banda, M. J. : Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo : Analysis of mRNA phenotype, *Science.*, 241 : 707~712, 1988.
 62. Antoniades, H. N., Galanopoulos, 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 fibroblast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88 : 565~569, 1991.
63. 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.
 64. Hauschka, P. C., Mavrakos, A. E., lafrati, M. D., Doleman, S. E. and klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix, J. Biol. Chem., 261 : 12665~12674, 1986.
 65. Lynch, S. E., Nixon, J. C., Colvin, R. V. and Antoniades, 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.
 66. 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.
 67. Pierie, G. F., Mustae, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. R., Griffin, G. L., Senior, R. M. and Deuel, T. F. : Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms, : J. Biol. Chem., 109 : 429~440, 1989.
 68. Lynch, S. E., Williams, R. C., Polson, A. M., Howell, T. H., Zappa, U. E. and Antoniades, H. N. : A combination of platelet-derived & insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration, J. Clin. Periodontol., 16 : 545~548, 1989.
 69. Lynch, S. E., Castilla, G. R., William, R. C., Kiritsy, C. P., Howell, T. H., Reddy, M. S. : 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.
 70. Lynch, S. E., Buser, D., Hernandez, R. A., Weber, H. P., Stich, H., Fax, C. H. and William, R. C. : Effects of the platelet-derived growth factors, 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.
 71. Rutherford, R. B., Niekrash, C. E., Kennedy, J. E. and Charette, M. F. : Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys, J. Periodont. Res., 27 : 285~290, 1992.
 72. 장영명, 이만섭 : 혈소판유래성장인자가 치주조직의 재생에 미치는 영향에 관한 연구, 경희치대논문집., 13 : 133~146, 1991.
 73. 조무현, 박준봉 : 혈소판유래성장인자-BB가 성견 치근이개부병변의 조직재생에 미치는 효과(인쇄중).
 74. Canalis, E. : Effect of platelet-derived growth factors on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, Metabolism., 30 : 870~975, 1981.
 75. Rutherford, R. B., Trilsmith, M. D., Ryan, H. E. and Charette, M. F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factors mitogenesis in vitro, Archs Oral Biol., 37 : 139~145, 1992.
 76. 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.
 77. Oates, T. W., Rouse, C. A. and Cochran, D. L. : Mitogenic effects of growth factors

- on human periodontal ligament cells in vitro, *J. Periodontol.*, 64 : 142~148, 1993.
78. Peterkofsky, B. and Diegelman, R. : Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins, *Biochemistry*, 10 : 988~994, 1971.
 79. Peterkofsky, B. and Prater, W. D. : Increased collagen synthesis in Kirsten sarcoma virus transformed BALB 373 cells grown in the presence of dibutyryl cyclic AMP, *Cell*, 3 : 291~299, 1974.
 80. Bessay, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum, *J. Biol. Chem.*, 164 : 321~329, 1946.
 81. Burch, W. M. and Lebovitz, H. E. : In vitro stimulation of alkaline phosphatase activity in immature embryonic chick pelvic cartilage by adenosine 3', 5'-monophosphate, *J. Cell Biol.*, 93 : 338~342, 1982.
 82. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 : 265~275, 1951.
 83. Nister, M., Hammacher, A., Mellstrom K., Siegbahn, A., Ronnstrand, A., Westermarck, B. and Heldin, C. H. : A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activities than a PDGF-AB heterodimer from human platelets, *Cell*, 52 : 791~803, 1988.
 84. Kazlauskas, A., Bowen-Pope, D., Seifert, R., Hart, C. E. and Cooper, J. A. : Different effects of homo- and heterodimers of platelet-derived growth factor and chains on human and mouse fibroblasts, *EMBO J.*, 7 : 3727~3731, 1988.
 85. Ramakrishnan, P. R. and Cho, M. I. : Identification of platelet-derived growth factor receptors on periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.*, 71 : 176 Abst No. 563, 1992.
 86. 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.
 87. 정성민, 이만섭, 권영혁, 조종만 : 혈소판 유래성장인자가 치주인대세포의 증식에 미치는 효과에 관한 연구, *대한치주과학회지*, 22 : 317~330, 1992.
 88. Narayanan, A. S. and Page, R. C. : A summary of current work, *Collagen Rel. Res.* 3 : 33~64, 1983.
 89. Bornstein, P. : Structurally distinct collagen types, *Ann. Rev. Biochem.*, 49 : 957~1003, 1980.
 90. Robinson, R. : XXXIII. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification, *Biochem. J.*, 111 : 286~293, 1923.
 91. Siffert, R. S. : The role of alkaline phosphatase in osteogenesis, *J. Exp. Med.*, 93 : 415~425, 1951.
 92. Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation, *FASEB J.*, 4 : 82~94, 1990.
 93. Nojima, N., Kobayashi, M., Shionomo, M., Takahashi, N., Suda, T. and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts, *J. Periodont. Rest.*, 25 : 179~185, 1990.
 94. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대 세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교, *대한구강생물학회지*, 15 : 14~27, 1991.
 95. Williams, L. T. : Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor, *Science*, 243 : 1564~1570, 1987.

THE STUDY ON EFFECTS OF THE PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR—AA, BB ON THE CELLULAR ACTIVITY OF THE HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Sang-Deok Oh, Jae-Mok Lee, Jo-Young Suh

Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyungpook National University

Current acceptable methods for promoting periodontal regeneration are based on removal of diseased soft tissue, root treatment, guided tissue regeneration, introduction of new graft materials and biological mediators.

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

The purposes of this study is to evaluate the effects of PDGF-AA, BB on the periodontal ligament cells to use as a regeneration promoting agent of periodontal tissue.

Human periodontal ligament cells were prepared from the first premolar tooth extracted for the orthodontic treatment and were cultured in DMEM/10% FBS at the 37°C, 5% CO₂ incubator.

Author measured the DNA synthesis, total protein, collagen and noncollagenous protein synthesis and alkaline phosphatase activity according to the concentration of PDGF-AA and BB (0, 0.1, 1, 10, 100ng/ml).

The results were as follows :

The DNA synthetic activity was increased dose dependently by PDGF-AA and BB. The maximum mitogenic effect was at the 100ng/ml of PDGF-AA and 10ng/ml of PDGF-BB.

The total protein, collagen and noncollagenous synthesis was increased dose dependently by PDGF-AA and BB. The % of collagen was slightly decreased according to the concentration of PDGF-AA and BB. The effect of PDGF-AA and BB were not specific for collagen synthesis since it also increased noncollagenous protein synthesis.

The effect of PDGF-AA and BB on alkaline phosphatase activity did not show any significant, meanwhile the alkaline phosphatase activity of 14 days group showed significant increase.

In conclusion, PDGF-AA and BB may have important roles in stimulation of DNA synthesis in human periodontal ligament cells, which means an increase in collagen-synthesizing cells, and may be useful for clinical application in periodontal regenerative procedures.