

물리적 외력이 배양중인 치주인대세포에 미치는 영향

김현영¹⁾ · 차경석²⁾

I. 서 론

교정력을 가했을 때 치아주위조직의 생물학적인 반응으로 압박측에선 골흡수가, 견인측에서는 골형성이 이루어지는 골개조현상으로 치아가 이동된다는 이론이 일반적으로 받아들여지고 있는데 이러한 골개조현상은 치조골 자체에서만 모두 수용하기는 어렵고 치주인대세포도 이러한 골개조현상을 담당할 것이라는 연구가 계속되고 있다¹⁻⁶⁾.

치주인대세포의 생물학적 특징에 대하여 시험관적 실험이 진행되어 Arnold와 Baram이 치주인대세포를 최초로 배양하였고⁷⁾ Brunette등⁸⁾은 치주인대조직으로부터 배양된 세포는 그 형태가 상피양세포와 섬유아양세포임을 발표하였고 Bolmlöf등⁹⁾은 치주인대조직의 초기배양시 상피양세포와 섬유아양세포로 배양하였으나 치주인대조직을 효소처리한 경우에는 섬유아양세포만 배양됨을 보고하였으며, Ragnarsson등¹⁰⁾은 사람의 치주인대로부터 유래된 섬유아양세포가 중층을 형성함을 보고한 바 있다. 또한 Nojima등¹¹⁾이 소의 치주조직과 치주인대세포에서 높은 Alkaline phosphatase의 활성도를 보이며 이중 치주

인대세포가 bone gla protein을 합성한다 하였고 Wasi¹²⁾, Fisher¹³⁾, Somerman등¹⁴⁾은 치주인대세포가 Osteonectin, Bone proteoglycan I, Bone sialoprotein I을 합성한다고 하여 치주인대세포가 조골세포로 분화될 가능성을 시사한 바 있다.

Leonard¹⁵⁾, Lilja¹⁶⁾, Kawase등¹⁷⁾은 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 높은 Alkaline phosphatase 활성도를 보인다고 보고한 바 있으며, Somerman등¹⁸⁾은 동일 환자, 동일 세대의 치주인대세포와 치은섬유아세포의 특징을 규명해 본 결과 치주인대세포가 총 단백질량, 교원질합성능 및 alkaline phosphatase activity가 높게 나타나 치주인대세포가 조골세포와 다소 유사한 양상을 띄고 있음을 보고하였다.

한편 Binderman등¹⁹⁾은 혼합골세포군 배양시 배양접시에 Orthodontic expansion screw를 이용, physical stress를 가하여 stretching된 embryonic calvarial cell에서 생산한 PGE₂와 cAMP의 level이 증가함을 관찰하였다. Ngan²⁰⁾ 및 Saito등²¹⁾은 같은 형태의 장치로 stretch된 human PDL fibroblast에서 prostaglandin 및 bone resorbing activity의 증가가 있음을 보고하였으며 Yousefian등²²⁾은 PDL cell에 hydrostatic pressure를 이용하여 negative pressure를 준 경우 치주인대세포는 증식하나, cAMP 및 Prostaglandin의 감소를 관찰하였고 Positive pressure를 준 경우 치주인대세포는 완전히 증식하

접수일 : 1994년 4월 1일

¹⁾ : 단국대학교 치과대학 교정학교실, 전공의

²⁾ : 단국대학교 치과대학 교정학교실, 부교수

고 cAMP 및 Prostaglandin 등이 촉진된다고 보고하였다.

본 연구는 치아에 orthodontic force를 가했을 경우 치주인대세포에서 일어나는 생화학적 특성의 변화를 알아보고자 *in vitro* 에서 배양된 치주인대세포에 mechanical force를 주어, cAMP 및 PGE₂의 변화와 ³H-thymidine incorporation 양에 의한 치주인대세포 성장정도를 측정하기 위하여 다음과 같은 실험을 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1) PDL cell culture in vitro

본 실험에 사용된 세포는 단국대학교 치과대학 부속 치과병원 교정과에 내원하여 상,하악 제 1소구치 발거를 요하는 환자로서 전신 질환이 없고, 건강이 양호하며, 임상적으로 치주질환이 없다고 판정된 환자의 치아를 발거, 채득하여 초기배양후 계대배양을 통하여 얻은 치주인대세포를 사용하였다.

치아를 발거하기 1주일전부터 환자에게 잇솔질을 잘하도록 하고, 클로르헥사메드(부광약품)로 양치하도록 권유한 후 무균상태에서 치주인대세포의 분리를 위하여 발거된 치아를 Penicillin, Streptomycin(Gibco) 및 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO)이 첨가된 minimum essential medium(MEM, GIBCO)으로 3-4회 세척을 한 후 치주인대를 currette을 이용하여 채득한 후 10% FBS가 포함된 minimum essential medium(MEM, GIBCO)이 들어있는 60mm culture dish(Corning)에 위치시킨후 37°C에서 95% 습도를 유지하면서 5% CO₂ 가 함유된 CO₂ incubator (Precision Scientific)에서 배양하였다. 10% FBS가 첨가된 MEM을 매일 교환하며 위상차현미경을 사용하여 배양조직으로부터 치주인대세포가 조직외부로 자라나오는 것을 관찰한 후 0.5% Trypsin 5.3mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA, Gibco)로 세포를 떼어내어 200xg로 4°C에서 10분간 원심분리하여 세포를 수집한 후 Hanks' balanced salt solution

(HBSS, Gibco)을 사용하여 2-3회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 MEM에서 35mm 배양접시에 1:5로 계대배양을 시행하였으며 이중 일부는 이후 실험을 위하여 세포를 수거하여 10% dimethylsulfoxide (DMSO, sigma)가 포함된 배양액에 넣은 후 서서히 냉동시켜 액체 질소통(MVE)에 저장하였다.

2) Applying Mechanical Stress

Culture dish 바닥 외면에 orthodontic expansion screw (Dentaram)로 연결된 두 부분의 acrylic resin을 접합시켰다. 치주인대세포에 mechanical stress를 적용시키기 위한 activation 방법으로 orthodontic screw를 2-3회 회전시켜 culture dish 바닥 외면에 접합되어있는 각각의 acrylic resin 부위가 벌어짐으로 인해 plastic dish가 변형되어 깨지기 직전까지 maximum activation시켰다.

3) cAMP determination

배양된 치주인대세포에 mechanical stress를 15분, 30분, 60분간 적용시킨 후 배양액을 제거하고 1ml의 6% ice-cold trichloroacetic acid (Sigma)를 첨가하여 rubber policeman으로 수집한 세포를 sonication하고, 1800xg으로 25분간 원심분리하여 얻은 상청액을 5ml water-saturated diethyl ether(Merck)로 4회 추출한 후 냉동 건조시켰으며, 침전물은 단백질정량에 사용하였다. cAMP는 냉동건조시킨 시료를 sodium acetate buffer(PH 6.2)에 용해시킨 다음 [¹²⁵I] cAMP RIA Kit(New England Nuclear)를 사용하여 radioimmunoassay방법으로 정량분석하였다.

4) PGE₂ determination

각 세포군에 20분, 40분, 60분간 mechanical stress를 적용시킨 후 배양액을 제거하고 1ml의 6% trichloroacetic acid를 첨가하여, Rubber

policeman으로 수집한 세포를 sonication하고, 1800xg로 25분간 원심분리하여 얻은 상청액은 냉동건조 시켰으며, 침전물은 단백질정량에 사용하였다. PGE₂는 냉동건조시킨 시료를 sodium acetate buffer(pH 6.8)에 용해시킨 다음, [¹²⁵I] PGE₂ RIA Kit(New England Nuclear)를 사용하여 radioimmunoassay방법으로 정량분석하였다.

5) Cell proliferation assay with 3H-thymidine Incorporation

세포성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 12, 24, 48시간 동안 activation하였고 각 시간대 4시간전 30 μCi tritiated-thymidine을 첨가하였으며, 5% TCA로 세척하였고 0.5N NaOH로 용해시켜 일부는 방사선 동위원소의 양을 측정하고 일부는 단백질 정량을 하였다.

III. 실험결과

Mechanical force를 준 후 치주인대세포내의 cAMP 변화량은 Table 1 및 Fig 1과 같으며, 대조군에서의 cAMP의 양은 77.6 Picomol이었고, activation후 15분에서 146.3, 30분에 82.3, 60분에 70.8로 15분후에 유의한 증가가 있었으며, 그 후에 점차 감소하는 양상을 나타내었다.

Mechanical force를 준 후 치주인대세포내의 PGE₂ 변화량은 Table 2 및 Fig 2와 같으며, 대조군에서 PGE₂양은 18.7 Picogram이었고 activation후 20분에 33.2, 40분에 31.5, 60분에 25.5로 20분에 유의하게 증가하다가 서서히 감소하였으며, 각 시간대 모두 대조군에 비해 증가양상을 보였다.

Mechanical force를 준 후 치주인대세포의 성장변화량은 Table 3 및 Fig 3과 같으며 세포내의 3H-thymidine incorporation양은 각 시간대 모두 증가하는 양상을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다.

Table 1. Effect of mechanical stimulus on the cAMP production of cultured PDL cells

	Control	15 min	30 min	60 min
cAMP (Pmol/mg protein)	77.6±12.2	**146.3±18.9	82.3±22.6	70.8±17.9

Values are Mean ± S.E (n=4-6) ** : p<0.01, compared to control

Table 2. Effect of mechanical stimulus on the PGE₂ production of cultured PDL cells

	Control	15 min	30 min	60 min
PGE ₂ (Pg/mg protein)	18.7 ± 2.6	**33.2 ± 2.2	31.5 ± 8.2	25.5 ± 1.8

Values are Mean ± S.E (n=4-6) ** : p<0.01, compared to control

Table 3. Effect of mechanical stimulus on the 3H-thymidine incorporation of cultured PDL cells

group \ time	12hrs	24hrs	48hrs
Control	5091 ± 435	3623 ± 434	3536 ± 389
Experimental	5260 ± 617	3839 ± 388	3957 ± 431

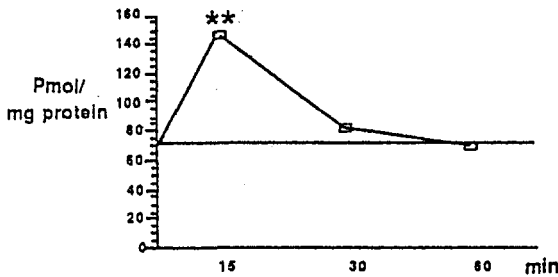


Fig. 1. Effect of mechanical stimulus on the cAMP production of cultured PDL cells.

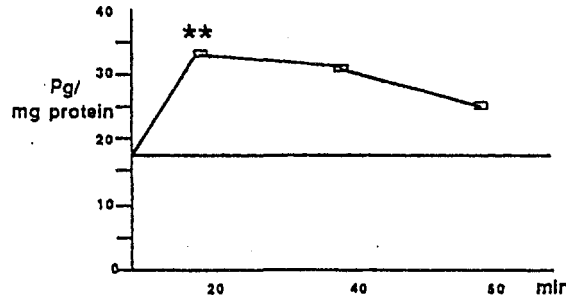


Fig. 2. Effect of mechanical stimulus on the PGE₂ production of cultured PDL cells.

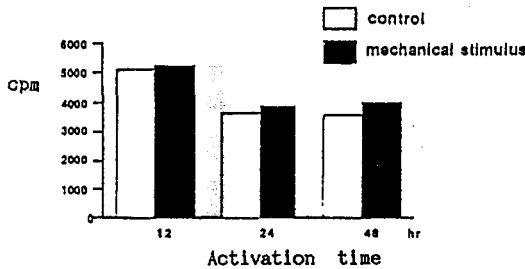


Fig. 3. Effect of mechanical stimulus on the ³H-thymidine incorporation of cultured PDL cells.

IV. 총괄 및 고안

교정치료시 치아의 압박측에서는 치조와의 표면과 골수강에 파골세포가 나타나서 치조골을 흡수하게 되고, 장력을 받는부위에서는 조골세포가 나타나 신생골을 첨가시키면서 치아는 이동된다. 치아의 이동은 궁극적으로 골개조의 과정에 관여하는 세포의 활성화에 의존하는 것으로 알려져 있으며, 치주인대세포도 이러한 골개조 현상을 담당할 것이라는 연구가 계속되고 있다 (1-6).

치주인대 세포가 Osteonectin, Bone Proteoglycan I, Bone Sialoprotein I을 합성한다고 하여 조골세포로 분화될 가능성을 시사한 바 있고 (12-14), 동일 환자, 동일세대의 치은 섬유아 세포에 비해 치주인대세포가 총 단백질량, 교원질합성능 및 alkaline phosphatase activity가 높게 나타나 조골세포와 다소 유사한 양상을 띤다고 보고되었다 (18). Binderman (19)은 혼합골세포군 배양시

배양접시에 orthodontic expansion screw를 이용, Physical stress를 가한 경우 PGE₂에 의해 매개되는 cAMP변화가 2차적으로 일어난다고 하고, PGE₂ 및 cAMP의 증가와 세포성장정도를 보고한 바 있다.

본 실험에서 치주인대세포의 배양은 단국대학교 치과대학 병원에 교정치료를 위하여 내원한 환자의 건강한 제 1소구치를 발거하여 explant culture하였고 배양중인 치주인대세포에 mechanical force를 적용하기 위하여 orthodontic expansion screw가 부착된 resin을 배양접시에 부착시킨 후 배양접시가 깨지기 전까지 2-3회 activation하였다. 각 시간별로 세포내의 cAMP 변화량을 알아보기 위해 mechanical force를 준 후 RIA로 측정된 결과 activation후 15분에서 cAMP가 유의하게 증가된 양상을 나타내었는데 이는 물리적 힘을 배양중인 골세포에 적용하여 약 15분경 cAMP의 증가가 최고치를 나타냈다는 결과 (19)와 일치된다고 사료된다. 배양중인 치주인대세포에 mechanical force를 가한 후 세포내의 PGE₂ 변화량은 각 시간대 모두 증가양상을 나타냈으며 특히 20분에유의한 증가가 관찰되었는데 이는 골세포군에 물리적 힘 적용후 20분경에 PGE₂ 증가가 최고치에 다다른 후 감소된다는 결과와 일치된다 (19). 또한 배양중인 치주인대 세포에 mechanical force를 가한 경우 세포내의 ³H-thymidine incorporation은 증가양상을 띄었으나 통계적 유의성이 없었는데, 골 세포군의 동일한 실험에서는 대조군에 비해 실험군이 약 1.5배 증가된 양상을 나타내었다고 보고된 바 있

다¹⁹⁾.

본 실험에서 배양된 치주인대세포에 mechanical force를 적용시킨후 PGE₂와 cAMP 생성의 변화 및 ³H-thymidine incorporation 정도변화로 세포활성화에 따른 치주인대세포가 골개조현상에 영향을 미치리라고 사료된다.

V. 결 론

본 실험에서는 Orthodontic force를 가했을 경우 치주인대세포의 생화학적인 특성을 알아보고자 배양중인 치주인대세포에 orthodontic expansion screw를 이용한 mechanical force를 준 결과 다음의 결론을 얻었다

1. 배양중인 치주인대세포에 mechanical force를 가한 경우 세포 내의 cAMP양은 force를 가한 후 15분후에 유의하게 증가하였으며, 그 후 시간이 흐름에 따라 점차 감소하였다.
2. 배양중인 치주인대세포에 mechanical force를 가한 경우 세포내의 PGE₂양은 force를 가한 후 20분, 40분, 60분대에 모두 증가되는 양상을 나타내었으며, 특히 20분에 유의한 증가가 관찰되었다.
3. 배양중인 치주인대세포에 mechanical force를 가한 경우 세포내의 ³H-thymidine incorporation은 증가하는 양상을 나타내어, 세포성장이 촉진되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.

REFERENCES

1. Aisenberg.M.S : The tissue and change involved in orthodontic tooth movement, Am. J. Orthod.34:354-357, 1948.
2. Reitan,K. : The tissue behavior during orthodontic movement, Am. J. Orthod. 46:881-900, 1960.
3. Reitan,K. : Biomechanical principle and reactions. current orthodontic principles and techniques. Graber,T.M., W.B.Saunders, Philadelphia, 56-159, 1969.
4. Reitan,K and Kvam,E. : Comparative behavior

- of human and animal tissue during experimental tooth movement, Angle Orthod.41:1-14, 1971.
5. Reitan,K. : Initial behavior during apical root resorption, Angle Orthod. 44: 68- 82, 1974.
6. Kvam,E. : Scanning electron microscopy of tissue changes in the pressure surface of human premolar following tooth movement, Scand. J. Dent. Res. 80:357- 368, 1972.
7. Arnold L.F.and Baram P. : In vitro culture of periodontal ligament cells. J. Dent. Res. 51:953-959, 1972.
8. Brunette, D. M, Melcher, A. H. and Moe, H. K.: Culture and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspensions, Arch.Oral Biol.,21:393-400, 1976.
9. Blomlof,L.,Otteskog,P. : Composition of human periodontal ligament cells in tissue culture. Scand.J.Dent,Res,89:43-47, 1981.
10. Ragnarsson,B.,Carr,G.,and Daniel,J.C. : Isolation and growth of human periodontal ligament cells in vitro, J.Dent.Res,64(8) :1026-1030, 1985.
11. Nojima,N.,Kobayashi,M., Shionome,M.,Takahashi, N.,Suda,T.and Hasegawa,K. : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. J.Periodont.Res. 25:179-185, 1990.
12. Wasi s.,Otsuka.,Yao K.L.,Tung P.S.,Aubin J.E., Sodek J., and Termine J.D. : An osteonectine-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. Can.J.Biochem.Cell.Biol.62:470-478, 1974.
13. Fisher L.W.,Hawkins G.R.,Tuross N., and Termine J.D. : Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II bone sialoproteins I and II,and osteonectine from the mineral compartment of developing human bone. J.Cell Biol. 262:259-265, 1987.
14. Somermane M.J.,Prince C.W.,sauj J.J.,Foster R. A. and Butler W.T. : Mechanism of fibroblast attachment to bone extracellular matrix: Role of a 44 kilodalton bone phosphoprotein. J. Bone Mineral Res. 2:259-265, 1987.
15. Leonard,E.P. : Enzyme histochemistry of periodontal pathogenesis in the rice rat. Cell. Mol. Biol. 24:241-248, 1979.
16. Lilja, E., Lindslog, S., and Hammarstrom, L. : Alkaline phosphatase activity and tetracycline incorporation during intial orthodontic tooth

- movement in rat. *Acta. Orthodol. Scan*, 42:1-11, 1984.
17. Kawase, T., Sato, S., Yamada, M., Hirayama, A., Miake, K., and Saito, S., Human periodontal ligament cells in vitro: characterization of alkaline phosphatase, *J. Bone Mineral Res.*, 1(suppl 1):63A, 1986.
 18. Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R., and Foster, R.A. : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, *J. Dent. Res.* 67:66-70, 1988.
 19. Dalasomjen, Itzhak Binderman, Esther berger and Arie harell : Bone Remodelling induced by physical stress is prostaglandin E2 Mediated, *Biochemica et Biophysica Acta*, 627:91-100, 1980.
 20. Ngan P.W., Crock B., Barghese J., Lanese R., Shanfeld J. and Davidovitch Z. Immunohistochemical assessment of the effect of chemical and mechanical stimuli on cAMP and prostaglandin E levels in human gingival fibroblasts in vitro. *Archs oral Biol.* 33, 163-174, 1988.
 21. Saito M., Saito S., Ngan P., Shanfeld J. and Davidovitch Z. Interleukin I beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 1990.
 22. Ngan P., Kleeman B., Jordan F., Yonsefian J., and Davidovitch Z. Effect of intermittent pressure on periodontal ligament cell-mediated bone resorption in Vitro. *The biological Mechanisms of Tooth Movement and craniofacial Adaptation.*, 1992.

- ABSTRACT -

THE EFFECTS OF MECHANICAL FORCE
ON CULTURED PERIODONTAL LIGAMENT CELLS IN VITRO

Hyun-young Kim, D.D.S., Kyung-Suk Cha, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Dan Kook University

The movement of teeth during orthodontic treatment requires bone remodeling process in periodontal tissue.

To find out the changes occurring in the cell itself, mechanical force was applied to the cultured periodontal ligament cells.

Following results were obtained from measuring the changes in cyclic AMP and PGE₂, ³H-thymidine incorporation amount in time lapse after application of mechanical force.

1. When mechanical force was applied to cultured PDL cells, the amount of cAMP in cells were increased significantly after 15 min. of force application, but were decreased gradually as time lapsed.
2. When mechanical force was applied to cultured PDL cells, the amount of PGE₂ were increased at 20,40,60 min. and was significantly increased at 20 min.
3. When mechanical force was applied to cultured PDL cells, the amount of ³H-thymidine incorporation was some increased, but was not statistically significant.

KOREA J. ORTHOD 1994 ; 24(2) : 295-301.

Key words : Mechanical Force, Culture, Periodontal Ligament Cell