

치주인대세포의 증식 및 세포활성에 미치는 1,25-(OH)₂D₃의 영향에 관한 연구

국윤아¹⁾ · 김상철²⁾ · 김형룡³⁾

1,25-(OH)₂D₃가 치주인대세포의 증식에 미치는 영향과 조골세포 기능을 나타내는 지표이며 골의 석회화 과정에 관여하는 alkaline phosphatase의 활성도에 미치는 영향을 관찰하여 아직 확실히 밝혀져 있지 않은 치주인대조직에 대한 1,25-(OH)₂D₃의 생물학적 기능을 알아보고자 교정 치료 목적으로 발거된 치아로부터 치주인대세포를 배양하였다. 1,25-(OH)₂D₃를 첨가하여 24시간 후 [³H]thymidine으로 DNA를 표지하여 세포의 증식을 관찰하였으며 1,25-(OH)₂D₃가 치주인대세포에서 조골세포의 표지효소인 alkaline phosphatase의 활성도에 미치는 영향을 24시간 또는 6일간 1,25-(OH)₂D₃ 처리 후 측정된 결과 100nM농도의 1,25-(OH)₂D₃은 치주인대세포의 증식을 유의하게 증가시켰으며 10nM에서는 차이를 보이지 않았다. 1,25-(OH)₂D₃을 24시간 첨가시 10nM에서는 ALP활성도는 80.8±31.4nmol로서 대조군 38.5 ± 5.3nmol에 비해 유의하게 증가하였으며 또한 1,25-(OH)₂D₃을 6일동안 첨가하였을때에도 10nM에서 106.7±23.0nmol로 대조군 29.3±1.0nmol에 비해 유의하게 증가되었다. 이상의 결과를 종합하면 1,25-(OH)₂D₃이 치주인대세포의 증식 및 세포기능을 시사하는 결과로 사료된다.

(주요단어 : 치주인대세포, Alkaline Phosphatase, 1,25-(OH)₂D₃, DNA합성)

I. 서 론

치아에 교정력을 가하면 치근막은 압축되거나 견인력을 받게 되며, 압박측에서는 파골세포가 나타나서 치조골을 흡수시키고 견인측에서는 조골세포가 나타나서 신생골을 첨가시키면서 치아가 이동하게 된다. 교정력에 의한 치아 이동은 치주인대 세포를 매개로 골형성과 골흡수 과정을 통하여 골개조가 이루어진다¹³⁾.

골조직은 태생후에도 지속적인 골흡수와 형성으로 이어지는 개조가 반복되는 동적인 조직이며¹⁴⁾ 이러한 골조직의 성장과 개조는 조골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성화에 영향을 미치는 여러가지 호르몬등의 전신적 인자와 cytokine같은 국소적

인자에 의하여 조절되고 있다^{18,21)}.

국소적 조절물질은 대부분 성장인자이며 골기질에서 발견되고, 골세포에 의하여 생성되며, autocrine action 또는 paracrine action으로 그 조절기능을 나타내는 것으로 알려져 있으며 전신적 인자는 parathyroid hormone(PTH), 1,25-(OH)₂D₃, calcitonin, estrogen 및 glucocorticoid등의 호르몬등이 여기에 속한다^{4,26)}.

비석회화된 결체조직으로서 다른 결체조직과 성격을 달리하며 흡수, 전달하는 기능을 하는 치주인대세포들은 교정적 치아이동시 인접한 백악질과 치조골의 개조에 중요한 기능을 담당한다고 알려져 있다¹⁵⁾.

치주인대세포는 조골세포의 기능을 나타내는 지표인 alkaline phosphatase활성도가 높으며 type I, III, V collagen을 합성하고 osteonectin, bone proteoglycan I, bone sialoprotein I등을 생성함으로써 치주인대세포는 다른 결체조직에 존재하는 세포와 다르며 경조직을 형성하는 세포의 특성과 유사하다는 연구가 계속 진행되고 있다^{16,23,24)}.

¹⁾원광대학교 치과대학 교정학교실, 조교수

²⁾원광대학교 치과대학 교정학교실, 부교수

³⁾서울대학교 치과대학 치과약리학교실

* 본 연구는 1994년도 원광대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어진 것임

Alkaline phosphatase(이하 ALP)는 골조직의 석회화에 매우 중요한 역할을 담당하며³⁶⁾, *in vitro*에서 기질세포에 의한 석회화에 관여하는 것으로 알려져 있다. ALP는 비교적 강한 결합조직에서 기질세포와 관련하여 나타나고 특히 석회화 조직에서 석회화 형성 초기에 현저히 증가하며, phosphatase는 조직액에 존재하는 organic phosphate 농도를 높이는데, 충분한 양의 inorganic phosphate ions이 축적되면 칼슘이온과 결합하여 골을 형성한다고 하였고 또한 ALP는 collagen calcification의 억제인자 inorganic pyrophosphate을 파괴함으로써 골형성 부위에 작용한다³⁵⁾. 이와 같이 ALP는 골석회화에 있어서 여러 다른 효소와 함께 임상적으로 중요한 효소중의 하나로 인식되고 있다.

1,25-(OH)₂D₃는 vitamin D₃의 대사물로서 경조직에 있어서 칼슘과 인산의 이동에 중요한 역할을 담당하고 있으며 1,25-(OH)₂D₃의 주요한 생리적 역할은 장에서 칼슘과 인의 흡수를 촉진하고 골흡수는 증가시키나 골형성은 억제한다고 Raisz²⁾가 보고하였고 이러한 효과는 고농도일때만 일어난다고 하였다. Collins과 Sinclair⁶⁾는 교정적 치아이동시 백서의 치근막내에 1,25-(OH)₂D₃를 국소적 투여결과 압박측에서 치조골 흡수가 많아져 교정적 치아이동시 임상적 적용 가능성을 제시하였다. 이와는 달리 Beresford 등²⁾은 사람의 골세포에서 제1형 교원질과 ALP 활성을 강력하게 증가시키고, Endo 등⁸⁾은 *in vitro*에서 골형성을 촉진한다고 하여 1,25-(OH)₂D₃의 효과가 상반된 보고를 하였다.

이에 본 연구는 *in vitro*에서 배양된 사람 치주인대세포를 이용하여 1,25-(OH)₂D₃가 치주인대세포의 증식에 미치는 영향과 조골세포기능을 나타내는 지표이며 골의 석회화과정에 관여하는 alkaline phosphatase의 활성도에 미치는 영향을 관찰하여 아직 확실하게 밝혀져 있지 않은 치주인대조직에 대한 1,25-(OH)₂D₃의 생물학적 기능을 알아보고자 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포배양

본 실험에 사용된 세포는 원광대학교 치과대학 부속 치과병원 교정과에 내원하여 상, 하악 제1소구치 발거를 요하는 환자로서 전신 질환이 없고, 건강이

양호하여, 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 세척한 후 치주인대를 currette을 이용하여 채득한 후 10% FBS가 포함된 α -minimum essential medium(MEM, Gibco)이 들어있는 60mm culture dish(Corning)에 위치시킨 후 37°C에서 95%습도를 유지하면서 5% CO₂가 함유된 CO₂ incubator 에서 배양하였다. 10% FBS가 첨가된 MEM을 매일 교환하며 위상차 현미경을 사용하여 배양조직으로부터 치주인대세포가 조직 외부로 자라나오는 것을 관찰한 후 0.5% Trypsin과 5.3mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA, Gibco)로 세포를 떼어 내어 1000x g로 4°C에서 10분간 원심분리하여 세포를 수집한 후 Hanks's balanced salt solution(HBSS, Gibco)을 사용하여 2-3회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 MEM에서 35mm배양접시에 1 : 3로 계대배양을 시행하였다.

2. 치주인대 세포 증식 및 DNA합성 측정

1,25-(OH)₂D₃가 치주인대 세포증식에 미치는 영향은 [³H]-thymidine을 이용한 DNA합성율으로써 관찰하였다. 배양한 치주인대세포군은 24well multidish(Nunc)에 분주하고 serum-free MEM 또는 10~100 nM 1,25-(OH)₂D₃(Genzyme Co)을 첨가한 배양액으로 교환하여 24시간 배양하였다. 배양기간중 마지막 4시간 동안 5 μ Ci의 [³H]-thymidine(Amersham, specific activity, 25 μ Ci/mmol)을 첨가, 배양한 후 5% ice-cold TCA(Sigma)로 세포를 고정시킨 다음 4회 세척하고 침전 분획을 0.5M NaOH로 용해하여 그 radioactivity를 liquid scintillation counter (Beckman Co, LS 5000TA)로 측정하였다. 측정된 값은 DPM(disintegration per minute)으로 환산하여 표기하였다.

3. Alkaline phosphatase 활성도 측정

1차 배양후 60mm culture dish(Corning)에 분주한

Table 1. Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on the [³H] thymidine incorporation into DNA of cultured periodontal ligament cells

Concentration		[³ H]thymidine incorporation (dpm/well)
Control		2048.6±330.2
1,25-(OH) ₂ D ₃	10nM	2402±730.3
1,25-(OH) ₂ D ₃	100nM	4513.7±818.3*

Values are Mean ± S.E. * : P<0.05

치주인대 세포군은 24시간 serum-free condition에 유지시킨 후 대조군은 계속 신선한 serum-free MEM으로, 실험군은 10-100nM 1,25-(OH)₂D₃를 첨가하여 24시간 배양하거나 6일간 배양하였다. 6일간 배양시는 4일째에 같은 농도의 1,25-(OH)₂D₃이 첨가된 배양액으로 교체하여 배양하였다. 배양후 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 수집한 다음 sonic dismembrator로 30% 출력에서 30초간 처리하고 일부는 효소활성 측정에, 일부는 단백질정량에 사용하였다. Alkaline phosphatase활성도는 0.1M glycine-NaOH buffer(pH10.3)를 완충용액으로 사용하고 15 mM p-nitrophenyl phosphate(Sigma)를 효소기질로 첨가하여 37°C에서 반응시킨 후 효소작용에 의해 기질로부터 유리된 p-nitrophenol의 양을 410nm에서 spectrophotometer를 사용하여 비색정량하였다.

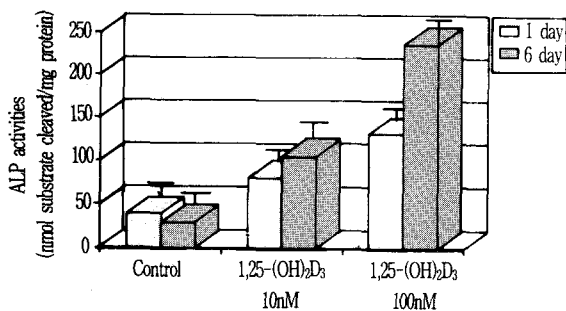


Fig. 1. Alkaline phosphatase activities of human periodontal ligament cells to varying concentrations of 1,25-(OH)₂D₃ were determined after 1 day and 6 days incubation periods

Table 2. Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on the alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells grown for 1 day or 6 days in the presence of 1,25-(OH)₂D₃

Concentration	Enzyme activity (nmol substrate cleaved/mg protein)	
	1 day	6 days
Control	38.5±5.3	29.3±1.0
1,25-(OH) ₂ D ₃ 10 nM	80.8±9.1*	106.7±23.0*
1,25-(OH) ₂ D ₃ 100nM	131.5±31.4*	237.7±45.0*

Values are Mean±S.E. * : P<0.05

III. 실험결과

치주인대세포를 배양하여 1,25-(OH)₂D₃의 영향을 관찰한 결과 치주인대세포의 증식에 있어서는 100 nM의 농도의 1,25-(OH)₂D₃첨가시 치주인대세포의 DNA합성이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으나 10nM의 농도에서는 대조군과 차이가 없었다 (Table 1).

Alkaline phosphatase활성도의 경우는 24시간 동안 1,25-(OH)₂D₃첨가시에는 10nM에서는 80.9±9.1nmol, 100nM에서는 131.5±31.4nmol로서 대조군38.5±5.3 nmol에 비해 유의하게 증가되었으며 또한 1,25-(OH)₂D₃을 6일동안 첨가하였을 때에는 10nM에서는 106.7±23.0nmol, 100nM에서는 237.7±45.0nmol로 대조군 29.3±1.0nmol에 비해 유의하게 증가하였다 (Table 2).

IV. 고 찰

골조직은 세포외기질과 여러 종류의 세포들을 포함하고 있는 복잡한 조직으로서 일생동안 흡수가 계속적으로 일어나는 동적인 조직이다. 교정치료시 치아의 이동은 치주인대세포를 매개로 골조직의 개조가 일어나는 과정으로 교정력이 어떻게 전달되어 골개조라는 결과로 나타나는지에 대한 정확한 기전을 알려져 있지 않으나 치아의 이동은 궁극적으로 골개조의 과정에 관여하는 세포들의 활성화에 의존하는 것으로 생각되고 있다²⁸⁾. 이와 같은 골개조 현상은 전적으로 기존의 치조골 자체에만 국한하여 일어나기 보다는 치주인대세포가 이러한 현상에 대한 역할을 할

것이라는 연구가 지속되고 있다.

치주인대세포가 치주조직이 재생에 관여하는 생화학적 매개체에 대하여 Somerman 등³³⁾은 동일환자 동일세대의 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성상을 규명해 본 결과 치주인대세포가 치은섬유아세포보다 총단백질과 교원질 합성능이 증가하고 더 높은 ALP 활성도를 나타내므로 치주인대세포가 골세포와 유사한 성질을 소유한 것으로 보고하였으며 Maeder¹⁶⁾등과 Piche 등^{23,24)}은 치은섬유아세포, 치주인대세포, 치조골세포를 배양 비교실험에서 치주인대세포는 치은섬유아세포와 골세포의 특성이 모두 존재한다고 주장하였다. 또한, Mariotti와 Cochran¹⁷⁾은 치주인대와 치은에서 유래된 섬유아세포에서 증식비율과 고분자 합성에 있어서 양 세포간에서 차이점을 발견했으며 이러한 차이점은 조직 재생술같은 *in vivo*에서 중요한 요소로 작용할 것이라고 하였다. Nojima 등²²⁾은 치주조직과 치주인대세포에서 높은 ALP 활성도를 보이며 조골세포로 확인할 수 있는 표지자인 bone gla protein을 치주인대세포가 합성할 수 있는 것으로 보아 치주인대세포는 조골세포나 백악아세포로 분화할 수 있으며 전형적인 조골세포의 표현형을 가지고 있다고 하였다.

Somerman 등³⁴⁾은 치주인대세포를 배양하여 여러 약제에 의한 cyclic-AMP의 양과 단백질 합성능 및 형성되는 단백질 종류에 대하여 실험해 본 결과 치주인대세포는 다소 조골세포와 유사한 양상을 띠고 있으나 전형적인 조골세포의 기능을 하지 않는다고 하여 다소 상반된 견해를 보고한 바도 있다.

이와 같은 치주인대는 치은결체조직과는 달리 골형성 능력이 있는 세포들이 잔재해 있을 것으로 생각되어 왔으며, Gould 등은 치주인대 조직내의 혈관 주변에 미분화된 전구세포를 관찰할 수 있다^{7,12,19)}고 하였고, Aukhil 등¹⁾은 치주인대내에 있는 전구세포는 치아의 상아질과 접촉시 백악아세포와 같은 재생 능력이 있는 세포로 분화한다고 하였다. McCulloch 등¹⁹⁾은 [³H]-thymidine을 이용한 자가방사법으로 치주인대내에 존재하는 조골세포와 백악아세포의 전구세포중 적어도 일부는 골내강에서 유래하여 치주인대내로 이주해 간다고 주장하였다.

Vitamin D₃는 cholecalciferol으로도 불리우는 물질로서 음식을 통해서 직접 Vitamin D₃가 흡수되기도 하지만 대부분은 7-dehydrocholesterol의 상태로 흡수되어 피부에 운반되면 자외선을 받아 Vitamin D₃로 전환된다. Vitamin D₃는 간에서 25-hydroxy-

cholecalciferol로 전환되고, 1,25-hydroxycholecalciferol은 신장을 순환하는 동안에 1,25-dihydroxycholecalciferol, [1,25-(OH)₂D₃]로 전환된다. 신장에서 형성된 1,25-(OH)₂D₃는 매우 생리적으로 활성을 띠는 물질로서 장과 신장에서는 칼슘흡수에 관여하여 체내 칼슘과 인산농도를 조절하는 기능을 가진 것으로 알려져 있다^{5,10)}.

또한 1,25-(OH)₂D₃는 vitamin D₃의 가장 강력한 metabolite로서 bone에 있어서 칼슘과 인의 이동에 중요한 역할을 담당하고 있으며 골세포에서 ALP를 강력하게 자극하는 것으로 알려져 있다²⁾.

골에서 1,25-(OH)₂D₃의 효과는 상반된 보고를 하고 있는데 Beresford 등²⁾은 사람의 골세포에서 제1형 교원질과 ALP 활성을 증가시키고, Endo 등⁸⁾은 *in vitro*에서 골형성을 촉진한다고 하였다. 그러나 Chen 등⁵⁾은 생쥐와 백서의 골세포 증식에 억제작용하는 것으로 보고하였다. ALP활성은 1,25-(OH)₂D₃에 의해서 조절되는데 1,25-(OH)₂D₃가 부족한 경우에는 골기질 합성과 연골성장의 억제와 골형성이 지연된다고³⁾ 하였으며, Erben 등⁹⁾과 Nakamura 등²⁰⁾은 골세포분화시에는 생리적인 농도가 중요한데 vitamin D₃ 대사물의 적정농도는 동물모델에서 골소실을 예방할 수 있다고 하였다. 이와같이 1,25-(OH)₂D₃가 골세포에서 매우 다양한 반응을 보이는 것은 실험동물의 species 차이와 세포의 기원, 그리고 세포의 밀도와 1,25-(OH)₂D₃ 첨가기간등 배양세포계의 차이에 의한 것으로 생각된다.

ALP는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로서 정확한 기능은 알려져 있지 않지만 Robinson³⁰⁾은 유기인산 기질에서 무기인산을 분리해 낼 수 있는 효소라고 하였으며 Siffert³²⁾는 골형성 이전의 세포대사와 칼슘과 인이온이 결정화되기 이전의 골기질 형성에 주로 관여한다고 보고하였다.

Franceschi 등¹¹⁾은 1,25-(OH)₂D₃이 미성숙간엽 골전구세포에서는 조골세포 표지인 ALP를 촉진하는 반면, 성숙 조골세포에서는 억제한다고 하였으며, Raisz와 Kream²⁵⁾은 1,25-(OH)₂D₃는 성숙골 형성세포에서 파골세포의 활성 및 형성을 촉진하고 조골세포 활성도를 동시에 억제함으로써 골대사 단위내에서 골흡수를 증가시킨다고 하였다. 이런 흡수단계 동안에 1,25-(OH)₂D₃는 전구세포들로부터 신생 골아세포의 성숙을 자극함으로써 신생골을 형성할 준비를 한다고 보고한 바가 있다.

본 실험에서도 배양된 치주인대세포에 1,25-(OH)₂

D₃을 첨가하여 치주인대세포의 증식과 ALP활성을 관찰한 결과 100nM첨가시 치주인대세포의 증식이 야기되었으며 10nM, 100nM첨가해서 24시간, 6일 동안 관찰했을 때 ALP활성이 증가하여 Beresford등²⁾도 보고한 바와 같이 골세포에서 ALP를 강력하게 자극하는 것과 유사한 결과를 보였다.

Reitan²⁸⁾ 그리고 Rygh³¹⁾는 교정력에 의한 치아 이동시 치조골의 변화에 대한 조직학적 고찰을 통하여, 교정력은 치주인대를 통하여 전달되고, 치주인대 및 그곳에 존재하는 세포들을 잘 관찰하는 것이 치아의 이동 기전에 관한 의문을 해결할 수 있는 방법으로 생각한다고 제시한 바 있으며, Roberts등²⁹⁾은 치아의 이동이란 결국 치주인대에 존재하는 전구세포가 활성화되고 성장 분화로 골 재형성에 직접적인 역할을 하기 때문에 교정력에 의한 골 개조에서 치주인대세포의 중심적 역할을 강조한 바 있다. 또한 1,25-(OH)₂D₃는 교정적 치아이동율을 빠르게 하는데 임상적 적용의 가능성을 Collins과 Sinclair⁶⁾이 제시하였지만 1,25-(OH)₂D₃의 최적용량, 주입횟수, 장기간 효과에서 잠재적인 국소 및 전신적 부작용에 대한 주의깊은 배려가 필요하다고 하였다.

본 연구에서도 치주인대세포에 1,25-(OH)₂D₃ 투여시 대조군에 비하여 유의한 ALP활성증가를 보여 치아이동시 나타나는 골흡수와 골침착에 상대적인 관련성을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 1,25-(OH)₂D₃가 치주인대세포의 증식과 표현형 발현을 촉진시켜 골조직 성장 및 개조에 중요한 조절기능을 나타낼 것으로 생각되나 여러 실험조건에 따라 그 효과가 다양하고 생체에서의 그 역할이 정확히 규명되지 않았기 때문에 이에 대한 1,25-(OH)₂D₃와 제1형 교원질, osteocalcin 활성도에 관한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

1,25-(OH)₂D₃가 치주인대세포의 증식에 미치는 영향과 조골세포 기능을 나타내는 지표이며 골의 석회화 과정에 관여하는 alkaline phosphatase의 활성도에 미치는 영향을 관찰하여 치주인대조직에 대한 1,25-(OH)₂D₃의 생물학적 기능을 알아보려 교정치료 목적으로 발거된 치아로부터 치주인대세포를 배양하였다. 1,25-(OH)₂D₃를 첨가하여 24시간 후 [³H] thymidine으로 DNA를 표지하여 세포의 증식을 관찰하였으며 1,25-(OH)₂D₃가 치주인대세포에서 조골세

포의 표지효소인 alkaline phosphatase의 활성도에 미치는 영향을 24시간 또는 6일간 1,25-(OH)₂D₃ 처리 후 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 100nM농도의 1,25-(OH)₂D₃은 치주인대세포의 증식을 유의하게 증가시켰으며 10nM에서는 차이를 보이지 않았다.
2. 1,25-(OH)₂D₃을 24시간 첨가시 10nM에서는 ALP 활성도는 80.8±31.4nmol로서 대조군 38.5±5.3 nmol에 비해 유의하게 증가하였으며 또한 1,25-(OH)₂D₃을 6일동안 첨가하였을 때에도 10nM에서 106.7±23.0nmol로 대조군 29.3±1.0nmol에 비해 유의하게 증가되었다.

이상의 결과를 종합하면 1,25-(OH)₂D₃이 치주인대세포의 증식 및 세포기능을 시사하는 결과로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Aukhil I, Simpson DM, Suggs C. and Petterson E. *In vivo* differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. : An experimental study using physical barriers. J. Clin . Periodontol 1986 ; 13 : 862-868.
2. Beresford JN, Gallagher JA, Russell RG. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and human bone derived cells *in vitro* : Effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. Endocrinology 1986 ; 199 : 1776-1785.
3. Bikle DD, Morrissey RL, Zolock DT, Rasmussen H. The intestinal response to vitamin D. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1981 ; 89 : 63.
4. Canalis E, McCarthy TL and Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. Endocrin Metabol Clin N Am 1989 ; 18 : 903.
5. Chen TL, Cone Cm, Feldman D. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and gluco- corticoids on the growth of rat and mouse osteoblast-like cells. Calcif Tissue Int 1983 ; 35 : 806-811.
6. Collins MK, Sinclair PM. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofac Orthop 1988 ; 94 : 278-284.
7. Davison L. and McCulloch CAG. Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations. J Periodont Res 1986 ; 21 : 414-428.
8. Endo H, Kitoki M, Kawashima K, Naruchi T and Hashimoto Y. Vitamin D₃ metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur *in vitro*. Nature(London) 1980 ; 286, 262-264.

9. Erben RG, Weister J, Sinowatz F, Rambeek WA, Zucker H. Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1992 ; 50 : 228-236.
10. Farley JR, Taylor AK, Baylink DJ. PTH and 1,25-(OH)₂D₃ can modulate the effect of a putative skeletal coupling factor *in vivo*. *Calcif Tissue Int* 1982 ; 34 : 538(Abstract).
11. Franceschi RT, Park K-Y, Romano PR. Regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D in human osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1988 ; 262 : 4165-4170.
12. Gould TRL, Melcher AH and Brunette DM. Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodont Res* 1980 ; 15 : 20-42.
13. Heuttner RJ, Whitman CL. Tissue changes occurring in the Macaque Rhesus monkey during orthodontic movement. *Am J Orthod* 1958 ; 44 : 328-345.
14. Kahn AJ, Partridge NC. New concepts in bone remodeling : An expanding role for the osteoblast. *Am J Otolaryngol* 1987 ; 8 : 258.
15. Limeback H, Sodek J, and Aubin JE. Variation in collagen by cloned periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 1982 ; 18 : 242-248.
16. Maeder CL, Carnes DL and Graves DT. Alkaline phosphatase and osteocalcin levels in cells from periodontal explants. *J Dent Res* 1988 ; 67 : 232 Abst.No. 958.
17. Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol* 1990 ; 61 : 103-111.
18. Martin TJ, KW Ng and Suda T. Bone cell physiology. *Endocrinol Met Clin N Am* 1989 ; 18 : 833-858.
19. McCulloch CAG, Nementh E, Lowenberg B and Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Ant Rec* 1987 ; 219 : 233-242.
20. Nakamura T, Nagai Y, Yamato H, Suzuki K, Orimo H. Regulation of bone turnover of prevention of bone atrophy in ovariectomized beagle dogs by the administration of 24,25 (OH)₂D₃. *Calcif Tissue Int* 1992 ; 50 ; 221-227.
21. Nijweide PJ, Burger EH and Feyen JHM. Cell of bones : Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. *physiol Rev* 1986 ; 66 : 855-886.
22. 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 Peodont Res* 1990 ; 25 : 179-185.
23. Piche JE, Catnes DL and Graves DT. Characterization of non-fibroblast cell population derived from human periodontal ligament. *J Dent Res* 1987 ; 66 : 356, Abst. No.1989.
24. Piche JE, Canes Jr DL and Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontium. *J Dent Res* 1989 ; 68 : 761-767.
25. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation. *N Engl J Med* 1983 ; 309 : 29-35.
26. Raisz RZ. Hormonal regulation of bone growth and remodelling. *Ciba Foundation Symposium*, 1988 ; 136, 226-238.
27. Raisz RZ. Recent advances in bone cell biology : interactions of vitamin D with other local and systemic factors. *Bone Mineral* 1990 ; 9 : 191-197.
28. Reitan K. Tissue rearrangement during retention of orthodontically rotated teeth. *Angle Orthod* 1959 ; 29, 105-113.
29. Roberts WE, Goodwin WC and Heiner SR. Cellular response to orthodontic force. *Dent Clin of North Am* 1981 ; 25, 3-17.
30. Robinson R. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem J* 1923 ; 17 : 286-293.
31. Rygh P. Periodontal response to tooth-moving force, In *Orthodontics : State of the art essence of science*, edited by Grber LW, Mosby, St. Louis, Toronto, London, 1986 ; 10 -115.
32. Siffert RS. The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J Exp Med* 1951 ; 93 : 415-425.
33. Somerman MJ, Prince CW, Sauj JJ, Foster RA and Butler WT. Mechanism of fibroblast attachment to bone extracellular matrix : Role of a 44 kilodalton bone phosphoprotein J, *Bone Mineral Res* 1987 ; 2 : 259-265.
34. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR and Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J Dent Res* 1988 ; 67 : 66-70.
35. Thomas CR, Wuthier RE. Effect of Vanadate, a potent alkaline phosphatase inhibitor, on ⁴⁵Ca and ³²P uptake by matrix vesicle enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* 1984 ; Vol.259, No.6.3511-3518.
36. Whyte MP, Teitelbaum SL, Murphy WA, Bergfeld MA and Avioli LV. Adult hypo-phosphatasia : Clinical, laboratory and genetic investigation of a large kindred with review of the literature. *Medicine* 1979 ; 58 : 329-337.

-ABSTRACT-

THE EFFECT OF 1,25-(OH)₂D₃ ON THE PROLIFERATION
AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY
OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Yoon-Ah Kook¹⁾, Sang-Cheol Kim¹⁾, Hyung-Ryong Kim²⁾

¹⁾Department of Orthodontics, School of Dentistry Wonkwang University,

²⁾Dental Therapeutics College of Dentistry Seoul National University.

The hormonally active vitamin D metabolite, 1,25-dihydroxy vitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃] is one of the several humoral factors that may regulate osteoblast differentiation. The purpose of this study was to evaluate the effects of 1,25-(OH)₂D₃ on the PDL cells. Human PDL cells were prepared from the first premolar tooth extracted for the orthodontic treatment and they were incubated in the environment of 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. [³H]-thymidine incorporation as a measure of proliferation potential and alkaline phosphatase activity were evaluated at 10nM, 100nM 1,25-(OH)₂D₃.

The observed results were as follows.

1. 1,25-(OH)₂D₃ was significantly enhanced [³H]-thymidine incorporation at 100nM, But did not affect by 10nM.
2. 1,25-(OH)₂D₃ was significantly increased alkaline phosphatase activity at 1 day and 6 days in a dose-dependent manner.

KOREA. J. ORTHOD. 1995 ; 25 : 333-339

※Key words : Periodontal Ligament, Alkaline Phosphatase, 1,25-(OH)₂D₃, DNA Synthesis.