

백서 골수세포의 석회화 과정에 미치는 치은 섬유아세포의 영향

김석용 · 권영혁 · 박준봉
경희대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

성인의 경우 치주질환의 발생빈도가 높고, 발견 당시에 이미 그 정도 또한 중증이상으로 진행되어 많은 지지골조직의 소실이 동반되는 것이 일반적이며, 따라서 연령 증가와 더불어 치조골의 소실은 증가되고 있음은 주지의 사실이다.

치주조직은 치은, 치조골, 백악질 및 치주인대로 구성되어 있고 이 중 치주인대는 백악질과 치조골의 사이에 존재하는 치밀한 결체조직으로 치아를 경조직인 치조골에 연결하고 있을 뿐 아니라 고유한 위치에 지탱하게 하여주는 중요한 요소이다. 이러한 치주조직은 그 형태학적 구조가 다양한 세포들의 집합체로 구성되어 소실된 조직의 재생을 위한 환경설정에도 많은 어려움이 있다.

치주조직 재생을 증가시키기 위한 방법으로는 첫째 Terranova(1987)¹⁾와 Caffesse(1988)²⁾등에 의한 치근면 처리제의 사용, 둘째로는 Gottlow 등(1984)³⁾과 Blumenthal(1988)⁴⁾ 및 Magnusson 등(1988)⁵⁾이 주장한 조직유도재생술이 있으며 골결손부의 재생을 위한 이식재에 관한 연구^{6,7)}가 있다. 그리고 술식의 개선으로 Gantes 등(1988)⁸⁾의 치관변위판막술이 있다. 최근에는 골원성 물질의 개발⁹⁾과 Polypeptide growth factor의 임상도입이 연구되고 있는 실정이다.^{10,11)}

근래의 세포 생물학 발전은 단위세포의 배양이 가능한 후로 세포화학적, 물리학적 분석법, 세

포주기의 분석법, 동조 배양법등으로 발전하여 의학 발전의 속도가 괄목하게 두드러졌다.^{12,13,14,15)}

치의학 분야에서도 세포 생물학의 발전은 연구방법론과 정확한 기전들의 규명하는데 많은 기여를 하여왔다. 인간의 배양 치은 섬유아세포와 치주인대 세포의 생화학적 성상을 비교 검토한 실험실적 연구에 의하면 치주인대 세포의 alkaline phosphatase activity에 관한 연구^{16,17)}, 토끼 치주인대세포의 석회화물질 형성에 관한 연구¹⁸⁾와 치근막인대세포의 신생 골양조직 형성에 관한 보고^{13,19,20)}등이 있다.

최근 Bruder와 Caplan(1989)²¹⁾, Haynesworth(1992)²²⁾, Klinefelter(1992)¹²⁾, Tenebaum등(1982)²³⁾, Williams등(1980)²⁴⁾은 골수세포를 배양하여 연골이나 골형성 세포로 분화하여 태생기의 골형성을 한다는 사실을 밝혀내었으며, 이러한 골수 유래 전구세포를 간엽세포라 하여 이 세포내에는 수종의 간엽 표현형을 갖고 있다고 보고하였다. 그리고 이들 간엽세포는 골조직, 골수, 근육, 결체조직, 인대, 연골등으로 다양하게 분화 가능하다고 알려지게 되었다^{25,14)}. 이러한 결과는 Ogushi등(1989)²⁷⁾과 박(1992)⁷⁾등에 의해 배양조건의 변화에 의해 발현되는 세포표현형에 차이가 나는 것이 보고되었다.

이에 따라 본 연구는 조골세포 석회화 과정의 기전 확인과 소실된 지지골 조직 재생 방법의 개

발을 위한 기초적 자료를 얻고, 골결손 부위의 재생과정에 주로 작용하게 되는 골세포를 배양하여 실험실적 연구에서 석회화 과정을 구명하여 치주조직의 치유과정에 혼재할 가능성이 높은 치은 섬유아세포와 세포의 혼합율을 달리하여 이에 따른 석회화 과정에 미칠 수 있는 영향을 관찰하여 이상적인 치주조직 조직 재생 방법을 모색하는데 목적이 있다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 치은 섬유아세포의 배양

교정치료를 목적으로 내원한 환자로부터 제1 소구치 발치시 건강한 치은조직을 채취하여 200unit/ml penicillin (Gibco, U.S.A.), 200 μ g/ml streptomycin (Gibco, U.S.A.)과 1 μ g/ml amphotericin-B (Gibco, U.S.A.)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, U.S.A.)으로 5회 세척후 배양접시에 넣고 1 X 1 X 1mm의 크기로 세절하였다. 세절된 조각편 10-15개를 35mm 크기의 세포배양용 접시에 넣은 다음, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, U.S.A.)과 100unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.5 μ g/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM을 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합 배양기(비전과학, 한국)에서 배양하였다. 섬유아세포(human gingival fibroblast, 이하 HGF로 표기)가 조직절편으로부터 증식되어 완전히 배양접시를 덮는 단층이 형성된 후에는 100mm세포 배양용 접시를 이용하여 7 - 10일 간격으로 1:3 계대배양을 시행하였다. 본 실험에서는 5 - 7 세대를 사용하였다.

2) 백서 골수세포의 분리

생후 5일 이내의 웅성 백서를 pentobarbital sodium (東京化成藥品株式會社, 日本) 을 100gm 당 5mg을 복강주사하여 마취, 희생시킨 후 무균적으로 대퇴부근육과 골막을 제거하고 경골을 채집하였다. 경골단을 수술도로 절단한

후 절단면을 통해 초기배양액을 25G 주사기로 왕복운동을 하면서 골수를 세척하여 세포현탁액을 수거하고 이를 1500rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 세포덩이를 재현탁액으로 만들어 100unit/ml의 penicillin, 100 μ g/ml의 streptomycin, 0.5 μ g/ml의 amphotericin-B가 포함된 10% FBS 함유 DMEM을 넣고 혼합하여 세포밀도를 1x10⁵cells/ml이 되도록 세포수를 산정하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3) 세포의 저장

100 mm 배양접시에 배양된 세포를 박리하여 1500rpm으로 5분간 원심분리한 후 10% DMSO가 함유된 0.5ml의 배양액에 현탁액을 만들고 polypropylene freezing vials에 균등분배하여 30분간 얼음위에 방치했다가 -20 $^{\circ}$ C 냉동실에서 1시간 예비냉동하여 -70 $^{\circ}$ C Deep freezer에서 24시간 보관하였다가 liquid nitrogen tank에 저장하였다. 냉동된 세포는 48시간후 녹여 회생물검사를 시행하고 실험이 진행될 때까지 보관하였다.

2. 연구방법

1) 혼합배양의 세포비

접종시 세포의 혼합비는 골수세포만 배양한 경우를 대조군하여 1군으로 하였고, 골수세포 70% 와 치은 섬유아세포 30%로 혼합한 경우를 2군, 골수세포 50% 와 치은 섬유아세포 50%로 혼합한 경우를 3군, 골수세포 30% 와 치은 섬유아세포 70%로 혼합한 경우를 4군, 치은 섬유아세포만을 배양한 경우를 5군으로 분류하여 본 실험을 시행하였다.

2) 세포의 세포증식증 측정

24 well 배양접시에 1 X 10⁴개의 HGF를 가진 배양액 0.5ml를 넣은 후 배양기에서 배양하였다. 배양 24시간후 세포가 배양접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 상층액을 제거하고 배양액을 각각 0.5ml씩 재주입하여 동일조건하에서 배양하였다. 계획된 시간후 배양된 세포는

trypsin으로 세포를 박리하고 hemocytometer를 이용하여 도립현미경하에서 세포수를 측정하였다.

3) 석회결절의 관찰

세포의 관찰은 西望 (1994)²⁸⁾의 방법을 이용하였다. 즉 세포를 일정 기간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 세척하여 10% neutral formalin solution에 30분간 고정한다. 그후 증류수로 2회 세척한 후 hematoxylin solution 으로 10초 염색 후 유수에 10 분간 세척한 후 eosin solution에 수초 재 염색한후 통법에 따라 세척 및 건조하여 봉입 관찰한다. 또한 석회화정도를 판정하기 위한 염색방법으로 칼슘과 chelate반응을 하는 Mcgee-Russel의 Alizarin red S염색을 하였다. 즉 10% neutral formalin solution에 30분간 고정한 후 세척하여 Alizarin red S 용액에 30초 염색하고 여과지로 염색액을 제거한 후 통법에 의해 탈수하고 xylene에 처리하여 봉입한다. 이때 칼슘염은 오렌지 혹은 붉은 색조로 농염된다.

III. 연구성적

1. 세포수 산정

최초 1×10^4 개의 치은 섬유아세포를 주입하여 배양 1, 2, 3, 7, 15 및 21일에 배양된 세포는 Trypsin-EDTA를 이용하여 박리하고 hemocytometer를 이용하여 도립현미경하에서 세포수를 측정하였다. 측정된 세포수는 치은 섬유아세포가 시간의 경과함에 따라 신속한 증식을 보인 반면 골수세포를 배양한 군은 증식속도가 늦었고 이러한 결과는 골수세포수가 증가한 혼합배양에서 두드러지게 나타났다. (Table 1, Fig. 1 참조)

3. 광학현미경 관찰

- 1) 치은 섬유아세포만 배양한 경우
세포들은 섬유아세포의 고유성질인 극성경향

Table 1. Number of the Cell of Co-cultured with Gingival Fibroblast and Bone Marrow Stromal Cell. ($\times 10^4$ cells/ml)

Cell	Day of culture						
	0.5	1	2	3	7	15	21
BMS	1.25	1.18	1.15	1.62	2.29	2.35	2.86
GFB	1.75	1.42	1.42	2.83	3.17	4.67	6.92

(Number of initial inoculated cell : 1×10^4 cell/ml)

* BMS : Bone marrow stromal cell
GFB : Gingival fibroblast

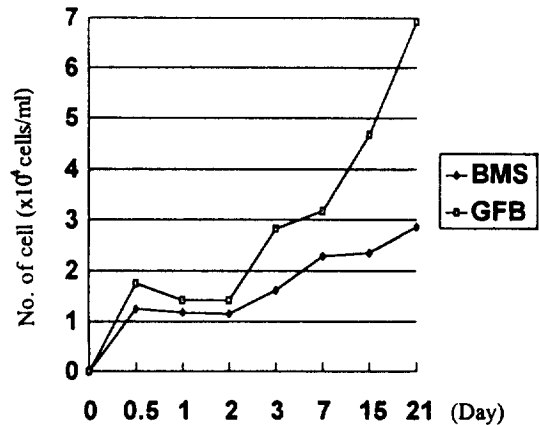


Fig. 1.

을 보이면서 밀생된 상태를 관찰 할 수 있었고 Alizarin red S 염색상에서 석회화 결절을 관찰할 수 없었다. (photo 1, 2 참조)

- 2) 치은 섬유아세포 70% 와 골수세포 30% 혼합배양의 경우

치은섬유아세포는 세포극성을 보이지만 골수 세포는 극성현상은 보이지 않고 밀집된상태만 관찰되었고 양 세포군사이에 경계부가 형성된 양상이 뚜렷해 졌다. 석회화결절은 찾아 볼 수 없었다. (photo 3, 4 참조)

3) 치은 섬유아세포 50% 와 골수세포 50% 혼합배양의 경우

골수세포가 군집한 부위에서는 세포들이 응집되어 밀집된 양상이 관찰되었고 Alizarin red S 염색상에서 소수의 세포가 연한 갈색으로 염색되어 나타났다. (photo 5, 6 참조)

4) 치은 섬유아세포 30% 와 골수세포 70% 혼합배양의 경우

비 염색상에서도 다수의 갈색으로 농염된 결정상이 관찰되었고 Alizarin red S 염색에서는 명확한 석회결절이 골수세포 밀집부의 중앙부에 나타났다. (photo 7, 8 참조)

5) 골수세포만 배양한 경우

대부분의 세포는 응집현상을 보였고 많은 수의 갈색 결절상이 관찰되었다. Alizarin red S 염색에 양성반응으로 나타난 결절이 많이 나타났다. (photo 9, 10 참조)

광학대한 골수세포만 배양한 배양접시에서 석회화 결절의 중앙부에는 Alizarin red S에 농염된 소립자형태의 양상이 관찰되었고 가장자리에는 다소 열게 염색된 활색상이 둘러싼 상을 관찰하였다. (photo 11, 12 참조)

IV. 총괄 및 고찰

치주질환의 진행과정은 부착치은의 소실과 함께 치주낭 형성과 지지조직인 치은결합조직, 백악질, 치주인대 및 치조골의 파괴를 수반하게 되지만 임상적으로는 그 증상이 뚜렷하지 않기 때문에 대부분 중증이상으로 진행된 후에 내원하게 된다.

치주인대는 백악질과 치조골 사이에 존재하는 치밀한 결합조직으로 치아를 경조직인 치조골에 연결하고 있을 뿐 아니라 고유한 위치에 지탱하게 하여 주는 중요한 요소이다. 이러한 치주조직은 그 형태학적 구조가 인체의 타부위에서는 발견할 수 없는 경도가 높은 경조직사이의 연조직으로 형성되고 또한 다양한 세포들의 집합체로

구성되어 소실된 조직의 재생을 위한 임상적 편경설정도 용이하지 않다.

재생형 치주치료의 방법에는 과거부터 다양하게 연구되어 왔으나 이를 종합하면 다음과 같다. 첫째 치근면에 연조직으로 부터의 세포 부착이나 이동을 용이하게 하고자 사용된 구연산이나 테트라사이클린 그리고 Fibronectin과 같은 치근면 처리제에 관한 Terranova (1987)¹⁾와 Caffesse (1988)²⁾의 연구가 있고, 둘째로는 Gottlow 등 (1984)³⁾의 Teflon 이나 Blumenthal (1988)⁴⁾의 콜라젠 혹은 Magnusson (1988)⁵⁾의 poly-lactic acid membrane 과 같은 세포분포를 선별적으로 증강하는 조직유도재료가 있으며, 셋째는 이들 자체로는 생물학적 물성을 가지지 않으며 신생골 성장에 비계역할을 하는 Hydroxyapatite나 β -Tricalcium phosphate 등의 비생활성 골전도물질에 대한 박 (1985)⁷⁾, Froum (1987)²⁹⁾ 등의 연구가 있다. 그리고 넷째로는 임상적 시술상의 재생을 도모하는 치관면 위판막술에 대한 Gantes 등 (1988)⁸⁾의 연구가 있고, 마지막 다섯번째로 탈회동결건조골이나 골혼화 및 골수등, 숙주의 결체조직 혹은 골세포를 자극하거나, 생활성 골형성세포를 제공하는 골유도물질 혹은 골원성 물질에 대한 Garrets 등 (1988)⁹⁾의 연구가 있다. 그러나 최근 Lynsh (1989)¹¹⁾와 조(1993)¹⁰⁾의 연구에 의하면 Polypeptide growth factor가 치주조직재생에 많은 가능성을 가진다고 제시되기도 하였다.

세포 생물학에 있어서 많은 학자에 의해 단위세포의 배양이 가능한 후로 cloning 이 가능해졌다는 사실은 세포의 화학적, 물리학적 분석법, 세포주기의 분석법, 동조배양법 등으로 발전하여 왔다. 세포배양법의 특징은 인간조직의 실험이 가능해졌다는 중요한 의미를 갖는다. 과거 예상하지 못했던 분야의 연구가 가능하여 특히 세포유합 기술은 2 종 세포의 잡종세포 (hybrid) 의 형성을 가능하게 하였고 염색체지도라든가 유전자 발현기전의 해석, hybridoma 형성에 이용되고 있다. 최근의 유전자도입기술 (transfection) 은 유전자의 동정, 그 기능의 해석, 유전자 발현기전의 설명등 분자유전학의 중요한 연구 수단

이 되었다.^{12,13,14,15)}

치의학 분야에서도 세포 생물학의 발전은 연구 방법론과 정확한 기전들의 규명하는데 많은 기여를 하여왔다. 인간의 배양 치은 섬유아세포와 치주인대 세포의 생화학적 성상을 비교 검토한 서 (1991)¹⁶⁾와 Ohshima (1988)³⁰⁾의 실험실적 연구에 의하면 치주 인대세포가 높은 alkaline phosphatase activity를 나타내고, 토끼의 치주 인대세포가 실험실적 연구에서 Alizarin red에 농염되는 석회화물질을 형성하는 것으로 보고되고 있다(原田 1992)¹⁸⁾. 또한 Melcher등(1986, 1987)^{19,20)}은 치주인대 세포를 골기질 상 및 상아질 기질상에 배양하면 신생 골양조직이 형성된다고 보고하고 있다.

이러한 최근의 연구에 의하여 Nojima 등 (1990)¹⁷⁾과 Arceo (1991)³¹⁾등 일부 학자들은 치주인대 세포를 골원성 섬유아세포 또는 osteoblastic fibroblast라고 부르기도 한다.

최근에 들어와 Bruder와 Caplan(1989)²¹⁾, Haynesworth 등(1992)²²⁾, Klinefelter(1992)¹²⁾, Tenenbaum 등(1982)²³⁾, Williams(1980)²⁴⁾, Nijweide (1982)³⁹⁾, Ogiso (1991)⁴⁰⁾, Syftestad (1985)⁴¹⁾ 등은 골수세포를 배양하여 연골이나 골 형성 세포로 분화하여 태생기의 골형성을 한다는 사실을 밝혀내고, 이러한 골수 유래 전구세포를 간엽세포라 하고 이 세포내에는 수종의 간엽 표현형을 갖고 있다고 보고하였다. 그리고 이 간엽세포는 골조직, 골수, 진피, 지방조직, 근육, 결합조직, 인대, 건, 연골등으로 다양하게 분화 가능하다고 Caplan (1990)²⁷⁾과 Nakahara (1990)¹⁴⁾ 등이 발표하였다. 이러한 결과는 Ogushi등 (1989)²⁷⁾ 과 박 (1992)⁷⁾에 의해 배양조건의 변화에 의해 발현되는 세포 표현형에 차이가 나는 것을 보고 하였다.

본 연구의 궁극적인 목적은 조골세포의 석회 과정에 대한 기전 확인과 소실된 지지골조직 재생방법의 개발을 위한 기초적 자료를 얻기 위하여, 실험실적 연구에서 증식 분화된 경골 골수세포를 이용하여 석회화 과정을 규명하고, 특수한 해부학적 구조를 지닌 치주조직의 이상적인 조직재생을 도모하기 위하여 치주조직의 구성세포

를 대상으로 세포배합율의 변화에 따른 석회화 과정에 영향을 규명하는데 그 목적이 있다.

파괴된 치주조직을 치료 방법중 골조직 회복이 가장 중요한 문제이며 연령의 증가로 인한 골소공증의 예방 및 치료분야의 연구에서도 조골 기전의 규명이 아직 미해결인 상태로 남아 있다. 의학의 분야에서 조골과정 연구에 세포 생물학의 발전은 연구 방법론과 정확한 기구들을 규명하는데 많은 기여를 하여 왔다. 치의학 분야 특히 치주과학 영역에서도 이러한 노력들이 진행되어 인간의 배양 치은 섬유아세포와 치주인대 세포의 생화학적 성상을 비교 검토한 Ohshima (1988)³⁰⁾ 의 연구 와 토끼의 치주인대 세포가 in vitro 상에서 석회화 물질을 형성하는 것을 原田 (1992)¹⁸⁾이 보고하였다. 또한 Melcher등은 (1986, 1987)^{19,20)} 치주인대 세포를 골기질 상 및 상아질 기질상에 배양하면 신생 골양조직이 형성된다고 보고하고 있다.

최근에 들어와 Bruder 와 Caplan(1989)²¹⁾ 등은 골수세포를 배양하여 연골이나 골형성 세포로 분화하여 태생기의 골형성을 한다는 사실을 밝혀내고 이러한 골수 유래전구세포를 mesenchymal stem cell이라 하고 이 세포는 배양조건의 변화에 의해 발현되는 세포 표현형에 차이가 있어 수종의 간엽 표현형을 갖고 있다고 보고하였다. 그리고 Ogushi등(1989)²⁷⁾과 Caplan(1990)²⁵⁾등은 이들 mesenchymal stem cell은 다양한 조직으로 분화가 가능하다고 발표하였다.

또한 氏家 (1993)³²⁾ 는 치조골로부터 배양한 세포에 He-Ne Laser를 조사하여 석회화를 촉진시키는 연구를 시도하여 Laser조사 횟수가 많아질수록 세포증가가 빨라졌으며 alkaline phosphatase activity의 활성이 증진되고 석회화 물질 형성이 촉진됨을 발견하였다. Bellows (1985, 1986)^{33,34)}는 백서의 두개관으로부터 골세포를 배양하여 glucocorticoids의 투여가 골수세포의 석회결정형성에 중요한 역할을 한다고 보고하기도 하여 석회물질 결정에 여러 요인이 작용함을 제시하였다.

최근의 池田 (1993)²⁶⁾, 松原 (1993)³⁵⁾ 등의 연구 동향을 보면 실험실적 연구에서 배양세포의 배

양조건에 따라 표현형의 차이가 있고 또 이들 배양세포를 이용한 조직재생방법을 모색하는 추세로 세포생물학의 임상화가 추진되고 있는 실정이다.

국내에서는 아직 세포배양술의 기술축적이 되어 있지 않아 치의학 영역에 많은 연구가 부족한 실정이나 최근들의 생명 공학 분야와 생물학, 농업등에서 신제품 개발에 세포배양법을 이용해 좋은 결과가 보고되고 있다. 치의학 영역에서는 단위세포의 배양을 시도해 그들의 형태관찰과 치은세포의 치근에의 부착양상 관찰 및 각종 호르몬들의 세포내의 영향을 관찰하는 등 점진적으로 세포 생물학을 기초로한 연구들이 부분적으로 진행되고 있는 실정이다.^{36,6,37,38,10)}

배양액 결정에 있어 실험실적 연구에서 형성된 골양조직은 유기질내에 포함된 phosphate ion에 의해 석회화(mineralize)되므로 적당한 농도의 phosphate ion이 필요하다. 이는 생체내에서 인의 농도가 증가하면 골화가 촉진된다는 선학들의 연구보고를 근거로 β -Glycerophosphate를 배양액에 포함하였다.^{12,13,14,15)}

국내 특히 치의학 영역에서는 세포 생물학을 이용한 구강내 조직의 분석이나 새로운 약제 및 재료의 개발을 위한 기술축적이 미흡한 실정이다. 현재 임상에서 사용되고 있는 골대체물의 사용은 모두 외국에서 시판되는 상품을 수입한 재료들이어서 막대한 외화의 손실을 가져오고 있고 또한 재료에 대한 근본 기전이 밝혀지지 않은 채 임상에서 사용하게 되는 경우가 대부분이므로 정확한 임상 적용기준을 설정할 수 있으리라 생각된다.

골수세포의 조골작용 기구의 이해와 아울러 최근 임상에 응용하고 있는 골대체물과의 혼용 가능성을 찾아내며, 이러한 확인과정과 분석과정에서 규명된 골대체물의 골형성과정에 대한 기전의 설명은 물론, 본 연구에서 축적된 기술은 차후 새로운 재료의 개발과정에 활용할 수 있는 좋은 자료가 될 것으로 생각된다.

본 연구결과 치은 섬유아세포의 증식속도는 골수세포의 증식속도보다 빠른 것으로 나타났

다. 이러한 결과는 일반적으로 창상 치유과정의 조직내에서 치은 섬유아세포가 치근면에 우선 부착하여 치근 흡수를 야기하는 근본적 기전 설명을 뒷받침하는 결과라 생각된다. 혼합 배양시의 세포증식에 대한 실험에서 세포수가 골수세포만 배양한 경우보다 통계학적 유의성을 인정할 수 없는 정도로 다소 높게 나타났으나, 이는 세포가 혼합되어 있어 어떤 세포의 증식이 더 신속한가를 분리 측정할 수 없었기 때문에 차후 세포박리를 시간 차이로 분리하여 측정해야 할 것으로 생각된다. 그러나 전체적 세포수는 두세포의 증식속도 범위내에 있기 때문에 혼합배양으로 인한 상승효과는 인정할 수 없었다.

본 연구에 사용된 Alizarin red S 염색법은 anthraquinone 염료로 조직 표면의 calcium 의 존재를 chelate반응으로 증명해주는 방법이며 이 염료는 magnesium, mangan, barium, strontium, iron등에도 반응하므로 calcium에 대한 특이적인 염색은 아니나 세포내 calcium외에 다른 성분이 많지 않기 때문에 문제되지 않는다. 골수세포의 석회화 과정에서 나타나게 되는 세포 외 기질형성의 석회결정의 추이변화 측정에서 골수세포의 혼합비가 높을수록 결절의 수가 증가하여 치은 섬유아세포와의 혼합배양이 석회결절 형성에 저해효과가 있는 것으로 나타났다.

본 연구의 결과를 근거로한 조골세포의 석회 과정에 대한 기전 확인과 이들에 대한 배양 환경의 변형은 치주질환의 치료방법의 새로운 개념을 확립하는데 기여할 것으로 사료되며, 차후 치주조직 결손부가 심하여 치아의 발거가 되는 많은 경우의 환자에게 자가 배양세포를 이용한 조직재생의 기전설명을 위한 자료를 제공할 것이며 이를 근거로 조직재생에 새로운 치료법을 시도할 수 있는 계기가 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

골수세포의 석회화과정에 대한 기전 확인과 조직재생과정에서 생체내에서의 치유과정은 단일세포가 아닌 수종의 세포가 혼재되어 상호작

용하게 된다는 사실을 근거로 소실된 지지골조직 재생방법의 개발을 위한 근거를 얻기 위하여, 생체에서 배양된 세포를 이용하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

백서 경골로부터 골조직을 채취, 골수세포를 초기배양 및 계대배양하여 배양 기본 조건을 석회화 결정형성이 가능한 배양액을 기준으로 정하고 이에 계획된 비율로 배양된 치은 섬유아세포를 혼합하여 배양한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

장기간 혼합배양으로 부터 얻은 세포의 증식을 검토에서 치은 섬유아세포를 주입하여 배양 1, 2, 3, 5, 7, 15 및 21일에 배양된 세포수는 치은 섬유아세포가 시간의 경과함에 따라 신속한 증식을 보인 반면 골수세포를 배양한 군은 증식 속도가 늦었고 이러한 결과는 골수세포수가 증가한 혼합배양에서 두드러지게 나타났다.

혼합배양에서 조골세포만 존재하는 경우가 가장 많고 점차 세포비율이 감소할 수록 형성된 결절의 수도 감소하는 경향을 보였다,

이상의 결과로 배양 치은 섬유아세포는 배양 골수세포의 석회화 과정에서 석회결절 형성에 방해요인으로 작용할 수 있는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Terranova, V.P. and Wikesjo, U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. *J Periodontol.* 58 : 371-374, 1987
2. Caffesse, R.G, Kerry, G.J., Chaves, E.S. et al : Clinical evaluation of the use of citric acid and autologous fibronectin in periodontal surgery. *J.Periodontol* 59 : 494-499, 1988
3. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin Periodontol.* 11 : 494-498, 1984
4. Blumenthal, N.M. : The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. *J Periodontol.* 59 : 830-836, 1988
5. Magnusson, I., Batick, C. and Collins, B.R. : New attachment formation following controlled tissue

- regeneration using biodegradable membranes. *J Periodontol* 59 : 1-4, 1988
6. 김용진, 정동균 : 골조직 배양에 있어서 골흡수에 미치는 Bovine Serum Albumin의 영향에 관한 연구. *대한구강생물학회.* 9 : 41-45, 1985
7. 박준봉, 서조영, 김해동 : Tricalcium phosphate가 치주인대세포의 성장에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 22(3) : 484-498, 1992
8. Gantes, B., Martin, M., Garret, S. and Egelberg, J. : Treatment of periodontal furcation defects. *J Clin Periodntol* 15 : 232-236, 1988
9. Garrets, S., Loos, B., Chamberlin, D. and Egelberg, J. : Treatment of intraosseous periodontal defects with a combined adjunctive therapy of citric conditioning, bone grafting, and placement of collagenous membranes. *J. Clin.Periodontol.* 15 : 383-387, 1988
10. 조혜연, 강선주, 고재승, 황성명 : Tumor Necrosis Factor- α 에 의하여 저칼슘식이 생쥐 골수세포에서 분화된 파골세포양세포의 상아질 흡수. *대한구강해부학회지* 17(1) : 99-112, 1993
11. Lynch, S.E., Williams, R.C., Polson, A.M. et al : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* 16 : 545-548, 1989
12. Klinefelter, G.R. : A novel system for the co-culture of epididymal epithelial cells and sperm from adult rats. *J. Tiss.Cult.Meth.* 14 : 195-200, 1992
13. McSheehy, P.M.H. and Chambers, T.J. : Osteoblastic cells mediate osteoblastic responsiveness parathyroid hormone. *Endocrinol.* 118 : 824-828, 1986
14. Nakahara, H., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E., Holecek, J.J., Baber, M.A., Goldberg, V.M. and Caplan, A.L. : Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11 : 181-188, 1990
15. Nakamura, O. and Caplan, A.L. : Noncollagenous matrix protein-enhanced mineral deposition in osteoblast-like cell culture. *J Bone Miner Met* 12 : 17-25, 1994
16. 서조영, 최계용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치은 섬유아세포와 치주인대세포의 세포 성장에 관한 비교. *대한구강생물학회지* 15(1) : 14-27, 1991
17. Nojima, M., Kobayashi, M., Shinome, 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
18. 原田秀一郎 : ウサギの歯根膜細胞の細胞特性 I. 石灰化物形成およびアルカフォスファターゼ活性 1992
 19. Melcher, A.H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E. and Shiga, E. : Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone : a light and electron microscopic study. *J. Periodont. Res.*, 21 : 592-612, 1986
 20. Melcher, A.H., McCulloch, C.A.G., Cheong, T., Nemeth, E. and Shiga, E. : Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro. *J. Periodont. Res.* 22 : 246-247, 1987.
 21. Bruder S.P. and Caplan, A.I. : First bone formation and the dissection of an osteogenic lineage in the embryonic chick tibia is revealed by monoclonal antibodies against osteoblasts. *Bone* 10 : 359-375, 1989
 22. Haynesworth, S.E., Baber, M.A. and Caplan, A.I. : Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13 : 359-375, 1992
 23. Tenenbaum, H.C. and Heersche, J.N.M. : Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 34 : 76-79, 1982
 24. Williams, D.C., Boder, G.B., Toomy, R.E. et al : Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 30 : 233-246, 1980
 25. Caplan, A.I. : Cell-mediated bone regeneration. cited in *The Bone-biomaterial interface*. University of Toronto Press, pp 199-205, 1991.26.
 26. 池田賀剛 : 人工骨移植材のヒト骨芽細胞様細胞に対する親和性 - 移植材周囲の接着性蛋白質の経時的変化 - *日歯周誌* 35(1) : 84-94, 1993
 27. Ohgushi, H., Goldberg, V.M. and Caplan, A.I. : Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J. Orthop Res* 7 : 568-573, 1989
 28. 西望 : 培養細胞おを用いた実験法 cited in 角野富三郎, 堀内義史, 西川克三, 松尾雄志, 通口富彦, 宮崎 香 : 分子細胞生物学 基礎実験法. 南江堂, 東京, pp 117-121, 1994
 29. Froum, S. and Stahl, S.S. : Human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. *J. Periodontol* 58 : 103-106, 1987
 30. Ohshima, M., Kuwata, F., Otsuka, K., Saito, R., Sato, K., Shioji, S. and Suzuki, K. : Alkaline phosphate activity of cultured human periodontal ligament cells. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 30 : 208-217, 1988
 31. Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R. and Somerman, M.J. : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J. Periodontol.*, 62 : 499-503, 1991
 32. 氏家久 : He-Ne レーザ照射がヒト歯槽骨由来細胞に及ぼす影響に関する研究 - とくに細胞増殖, 活性および nodule 形成について - *日歯周誌* 35(1) : 54-62, 1993
 33. Bellows, C.G., Aubin, J.E. and Heersche, J.N.M. : Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrin.* 121(6) : 1985-1992, 1985
 34. Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M. and Antosz, M.E. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.* 38 : 143-154, 1986
 35. 松原茂 : 歯根膜細胞の分化調節に関する実験的研究 - Transforming Growth Factor- β の影響について - *日歯周誌*, 35(2) 333-346, 1993
 36. 이종원, 김관식, 정동균 : 백서태두개관 배양시 Prostaglandin E2 가 용해소체 효소 유리에 미치는 영향. *대한구강생물학회*. 7 : 25-31, 1983
 37. 이 향, 박준봉 : 치근면의 구연산 탈회가 치은섬유아 세포의 부착 및 증식에 미치는 영향 *경북치대논문집*. 6(1) 23-36, 1989
 38. 이진미, 서조영, 박준봉 : 치주인대 세포의 부착과 전개에 관한 형태학적 관찰. *대한치주과학회지* 23(1) : 97-108, 1993
 39. Nijweide, P.J., van Iperen-van Gent, A.S., Kawilarang-de Hass, E.W.M., van der Plas, A. and Wassenaar, A.M. : Bone formation and calcification by isolated osteoblastlike cells. *J Cell Biol* 93 : 318-323, 1982
 40. Ogiso B, Huges FI, Melcher AH, McCulloch CAG : Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol* 146 : 442-450, 1991)
 41. Syftestad GT, Weitzhandler, M and Caplan AJ : Isolation and characterization of osteogenic cells derived from first bone of the embryonic tibia. *Dev Biol* 110 : 275-283, 1985

EXPLANATION OF PHOTOMICROGRAPHS

- Photo 1.** Photomicroscopic view of gingival fibroblast cells only on day 10 of culture in phase contrast inverted microscope.
(Non stained view x 40) Multilayer of cell growth were observed. Most of the cells showed high polarizing tendency in culture.
- Photo 2.** Photomicroscopic view of gingival fibroblast cells only on day 10 of culture in phase contrast inverted microscope.
(Alizarin red S stained view x 40) Non of mineralized nodule were found among the cells.
- Photo 3.** 30% of Bone marrow stromal cells mixed 70% of gingival fibroblast on day 10 of culture. (Non stained view x 40)
Gingival fibroblast and bone marrow stromal cell revealed different style of growing pattern respectively.
- Photo 4.** 30% of Bone marrow stromal cells mixed 70% of gingival fibroblast on day 10 of culture. (Alizarin red S stained view x 40)
Non of mineralized nodule were found among the bone marrow stromal cells.
- Photo 5.** 50% of Bone marrow stromal cells mixed 50% of gingival fibroblast on day 10 of culture. (Non stained view x 40)
Some part of cultured cells were formed densely aggregated growing pattern toward certain center.
- Photo 6.** 50% of Bone marrow stromal cells mixed 50% of gingival fibroblast on day 10 of culture. (Alizarin red S stained view x 40)
Brownish stained cells were found in palte but not formed mineralized nodule.
- Photo 7.** 70% of Bone marrow stromal cells mixed 30% of gingival fibroblast on day 10 of culture. (Non stained view x 40)
Many slight brownish stained part were observed.
- Photo 8.** 70% of Bone marrow stromal cells mixed 30% of gingival fibroblast on day 10 of culture. (Alizarin red S stained view x 40)
Many of mineralized nodule were found among the bone marrow stromal cells.
- Photo 9.** Bone marrow stromal cells only on day 10 of culture. (Non stained view x 40) Most of cells were aggregated in culture, and showed pale brownish color stained.
- Photo 10.** Bone marrow stromal cells only on day 10 of culture. (Alizarin red S stained view x 40)
Many of Alizarin red S positived nodules were found, and there were connected pattern between more than two nodules.
- Photo 11.** Bone marrow stromal cells only on day 10 of culture. (Non stained view x 100)
Large mineralized nodules were found. **Photo 12.** Bone marrow stromal cells only on day 10 of culture. (Alizarin red S stained view x 100) Mineralized nodule showed dark brown staining at the center and yellowish color at border of the nodule.

논문사진부도①

논문사진부도②

THE EFFECTS OF GINGIVAL FIBROBLAST ON THE MINERALIZATION OF THE RAT BONE MARROW STROMAL CELL.

Seuk-Yong Kim, Young-Hyuk Kwon, Joon-Bong Park
Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung-Hee Univeristy

The purpose of this study was performed to investigate the mineralization and differentiation of osteobalsts for bone regeneration in vitro and the effect of rate of the composition in periodontal cells on mineralization.

For this study, healthy gingival tissues were surgically obtained from the patients during 1st premolar extraction for the purposes of orthodontic treatment. Gingival tissue was washed several time with Phosphate buffered saline contained high concentration of antibiotics and antifungal agent, and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, U.S.A.). Every cell were cultured in state at 37 °C, 100% of humidity, 5% of CO₂ incubator. Bone marrow stromal cells were isolated from 5-day-old rat femur with using medium irrigation method by syringe. Cell suspension medium were centrifuged at 1500 rpm for 5 min and then cultured in the petri dish. Two kinds of cell were freezed and stocked in the liquid nitrogen tank until experiment.

Cell were incubated into the 24 multi-well plate with 5×10^4 cell/well of medium at 37 °C, 100% of humidity 5% CO₂ incubator for 24 hours. After discarded of the supernatent of medium, 0.5ml of medium were reapplied and incubated. And counted the number of cell using the hemocytometer and inverted light microscope.

We have measured the number of mineralized nodule with using Alizarin red S. staining in microscope. Furthermore every cell were observed the morphological change between every rate of co-culture of the two kinds of cell.

The results were as follows:

The rate of proliferation of co-culture cell revealed high rate tendency compared the bone marrow stromal cell only and low growth rate to compared with gingival fibroblast only.

The tendency of formation of the mineralized nodule were observed dose-depend pattern of bone marrow stromal cell.

It is concluded that the gingival fibroblast may inhibit the formation of mineralized nodule in the culture of the bone marrow stromal cell.