

Fibronectin과 성장인자의 단독 혹은 복합투여가 배양 인체 치은섬유모세포 및 치주인대 세포의 활성화에 미치는 효과

김응태 · 한두석 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주염은 치아주위의 지지 치조골과 결합조직의 상실을 동반하는 치주낭 형성으로 특징 지워진다. 이러한 치주염의 치료는 치은염증 과정의 해소와 더불어 치주질환의 진행을 예방하는 것뿐만 아니라 질환으로 인해 상실된 치주조직을 재확립시키거나 재생시키는 데 목적을 두고 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해서는 치주인대의 전구세포가 노출된 치근에 이주, 부착되어야 한다. 더불어 치주인대 세포는 조직화되고 기능적인 섬유성 부착기구내로 증식되고 성숙되어야만 한다.

치주염에 이환된 치근표면에 치주인대 세포에서 유래한 새로운 결합조직의 부착이 일어나는지에 대해서 오랫동안 논의되어 왔으나 치주염의 치료후 치근표면에 새로운 결합조직의 부착이 일어난다는 것이 최근의 조직학적 연구에서 밝혀졌다¹⁻⁶⁾. 그러나 임상적으로는 성공이라 할수 있는 많은 증례에서 조직학적으로는 치근표면을 따라 부착상피가 증식하는 것이 관찰되었다⁶⁾. 이것은 치주치료후의 조직 재생이 신생결합조직 부착으로만 일어나는 것이 아니라는 것을 보여준다.

치유과정중 상피의 개재는 노출된 치근면에 치주인대 세포의 부착을 방해하고 이에 따른 이상적인 치주조직의 재생을 방해한다. 그러므로 치주질환으로 인해 상실된 치주조직의

재생은 치유되는 치주창상부위로부터의 치은결합조직과 상피의 배제가 요구되어진다. 이러한 이상적인 치주병소의 치유를 위해 과거 수십년간 연구가 진행되어 왔다. 이중 대표적인 방법이 물리적 장벽을 이용한 조직유도 재생술이다⁷⁾. 이는 상피의 치근면으로의 하방이동을 방지함으로써 치근면으로 치주인대가 이주하기 위한 공간 및 기회를 확보하며, 치근흡수 및 치근유착을 일으키는 것으로 알려진다^{8,9)} 치은 섬유모세포의 치근면으로의 이주를 방지하여 신부착을 유도하는 술식이다.

신부착에 있어 초기단계에서 가장 중요한 것은 치주인대에서 유래된 치근면으로의 부착 능력이다. 그 다음으로는 부착된 치주인대 유래세포의 성장이다. 이렇게 부착된 세포의 성장에 대한 연구의 시도로, 성장인자라고 알려진 분자집단을 이용한 여러 실험들이 있다¹⁰⁻¹⁵⁾.

치주인대 유래세포의 치근면으로의 부착을 돕는 물질중의 하나는 Fibronectin이다. Fibronectin은 혈장으로부터 분리되는 고분자량의 glycoprotein이다¹⁶⁾. 이것은 또한 섬유모세포¹⁷⁾, 상피세포¹⁸⁾, 내피세포¹⁹⁾로부터 생산되기도 한다. Baum과 Wright²⁰⁾는 인간의 치은섬유모세포에서 fibronectin을 분리해냈다. 여러 실험실적 연구에서 Fibronectin의 중요성이 언급되었다. Terranova와 Martin²¹⁾ 등은 치주질환에 이환된 치아에서 조직배양을 통해 섬유모세포와 상피세포의 부착을 평가했다. Caffese와 Ca-

rols등²²⁾은 배양액에 fibronectin의 추가가 섬유모세포의 부착과 증식을 증가시킨다고 보고했다. Wirthlin등²³⁾은 fibronectin이 결합조직 세포의 부착효과를 증진시킨다고 주장하였다. 반면 Guy와 McQuade등²⁴⁾은 그들의 실험에서 치은섬유모세포 배양시 50 μ g/ml 농도의 fibronectin을 첨가했을때 다양한 implant 재료에 대해 세포부착수의 증가를 관찰할수 없었다고 보고했다. 또한 Rompen등²⁵⁾은 상아질에 fibronectin의 처리가 세포부착에 유의한 효과가 없었다고 주장했다.

치주조직의 재생에서 치근면에 일단 치주인대 유래세포가 부착한후 그다음으로 중요한 것은 이러한 세포들이 섬유성 조직내로 증식되고 성숙되어야만 한다는 것이다. 이러한 증식과 성숙을 돕는 물질이 성장인자라고 알려진 분자집단들이다. 그 중에서 Fibroblast growth factor(FGF)는 성장인자의 일종으로 7종류가 동정되어 있다²⁶⁾. 그러나 단지 두종류, 즉 acidic FGF(aFGF)와 basic FGF(bFGF) 만이 완전히 분리되어 있다. 이 두가지 인자는 초기에 신경조직에서 분리되었으나 결국은 다양한 조직에서 발견된다²⁷⁾. aFGF와 bFGF는 유사한 생물학적인 활성을 가지고 있고 그들의 아미노산 염기배열 순서의 55%의 동질성을 가지고 있다²⁸⁾. Basic 형태가 Acidic 형태에 비해 30~100배의 활성을 가지고 있다. Terranova등²⁹⁾은 치주인대세포가 FGF 수용기를 가지고 있으며, FGF는 치주인대세포에 대해 mitogenic activity와 화학주성 능력을 높였다고 보고했다²⁹⁾.

따라서 본 연구의 목적은 치주조직의 재생에서 일차적으로 중요한, 치근면으로의 섬유모세포 부착과 연관된 fibronectin의 실험실적 투여가 배양인체 치은섬유모세포와 치주인대세포의 부착에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보고, fibronectin, FGF가 단독 혹은 복합 투여되었을때 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위함이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 배양
 임상 및 방사선학적으로 치은염증 및 치주염의 소견이 없는 건강한 치아를 발치한 후 치은을 절제하였다. 절제한 치은을 40% 우태아 혈청(Fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 20% 항생제(Penicillin G, Streptomycin, Amphotericin B 포함, Gibco Co., USA)를 가한 a-MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co., USA)으로 3회 세척하였다. 치은조직을 세척한 후 60mm 세포배양용 배양접시(Nunc Co., USA)로 옮겨 약 1mm²로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직의 가장 자리가 배양접시에 잘 부착되도록 주의하면서 잘 퍼놓은후에 20분간 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기(Bantex 1820IR, SHEL-LAB, USA)에서 배양접시에 고르게 부착되도록 배양시킨후, 각 배양접시당 2ml의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 첨가한 a-MEM을 가하고 단일세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 3일간 배양후 배양접시내의 배양액을 제거하고 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS, Gibco Co., USA)으로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한후 0.25% Trypsin/EDTA (10%, Gibco Co., USA)를 배양접시당 2ml 씩 넣고, 3분간 bench 상에서 방치한후 피펫을 이용하여 배양접시에 부착된 부착세포를 분리시키고 5ml 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원침하였다. 원침후 상층액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한후 Vortex mixer로 혼합하고 세포 부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다. 분주 비율은 1:3내지 1:4로 하고 5회 계대배양하여 본 실험에 이용하였다.

2) Fibronectin과 성장인자의 준비

치은섬유모세포와 치주인대세포의 부착을 평가하기 위해 Fibronectin (Sigma Co., USA)

을 10 μ g/ml, 20 μ g/ml로 stock solution을 만들어 준비했다. 또 FGF와의 혼합투여시 세포의 활성을 보기 위해서 20 μ g/ml, 50 μ g/ml의 stock solution을 만들었다. FGF(Sigma, Co., USA)는 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml의 stock solution을 만들었다.

2. 연구 방법

1) Fibronectin이 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 부착에 미치는 영향

각 실험에 앞서 24 well plate에 well당 세포가 6000개가 되도록 분주하기 위해 trypan-blue로 염색한후 hemocytometer에 옮겨 도립현미경 상에서 세포수를 세어 부착이 되도록 분주시에 fibronectin 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 을 동시에 투여하고 10, 30, 60, 90분간 배양후 도립현미경 (IMT2-21. Olympus. Japan)을 이용하여 각 군의 세포부착정도를 보기 위해 식염수에 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA) 용액 50 μ l를 각 Well에 넣고 3시간동안 배양후 MTT 용액을 버리고 DMSO를 50 μ l씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해시킨후 세포활성도의 측정을 위해 96 well plate 상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든후 ELISA analyser (Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)를 이용하여 부착된 세포의 세포활성도를 통해 부착정도를 평가했다.

2) Fibronectin, FGF의 단독 혹은 혼합투여가 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성에 미치는 영향

실험 전일 24 well plate에 분주한 치은섬유모세포와 치주인대세포에 fibronectin을 단독으로 가한 군에서는 20 μ g/ml, 50 μ g/ml을 가하였고, FGF를 단독으로 가한 군은 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 을 가하였다.

Fibronectin과 FGF를 혼합 투여한 군에서는 fibronectin 20 μ g/ml과 FGF 5ng/ml을 가한 군, fibronectin 20 μ g/ml과 FGF 10ng/ml을 가한 군, fibronectin 50 μ g/ml과 FGF 5ng/ml을 가한 군,

fibronectin 50 μ g/ml과 FGF 10ng/ml을 가한 군으로 나누어 24, 48, 72시간 배양하였다. 각군의 세포활성을 보기 위해 식염수에 용해한 MTT(3-(4.5-dimethylthiazole-2-yl)-2.5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA) 용액 50 μ l를 각 well에 넣고 3시간 동안 배양후 MTT 용액을 버리고 DMSO를 50 μ l씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해시킨후 세포활성도의 측정을 위해 96 well plate 상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣은 다음 630nm를 기준으로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 각 군마다 4배수로 시행하였으며, 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 모든 실험결과는 다음과 같이 대조군의 백분율로 산출하였다.

세포활성도(%) = 실험 well의 흡광도/대조 well의 흡광도 \times 100

3) 통계 분석

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포활성의 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적인 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석하였다.

III. 연구성적

Fibronectin이 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 부착에 미친 영향

Fibronectin 10, 20 μ g/ml을 치은섬유모세포와 치주인대세포에 각각 10, 30, 60, 90분간 가하였을때 각각 다음과 같은 결과가 나타났다.

치은섬유모세포군에서 fibronectin 10, 20 μ g/ml 모두에서 대조군보다 감소한 세포의 부착을 보였으며, 특히 fibronectin 30분과 90분 처리시, 대조군과 20 μ g/ml군은 통계학적으로 유의성이 있었다. 그리고 60분군은 각군끼리 서로 통계학적 유의성을 나타냈다. 그러나 시간이

경과할수록 거의 대조군 수준으로 돌아오는 경향을 보였다(Table 1), (Fig 1 A).

치주인대 세포군에서도 역시 전군 모두에서 대조군보다 감소된 부착도를 보였는데 시간이 경과할수록 점차 대조군 수준으로 회복되는 경향을 나타냈다. 그리고 통계학적인 유의성은 90분 군에서만 제외하고 전군에서 각군끼리 모두 유의성이 있게 나타났다(Table 2), (Fig 1B).

2. Fibronectin과 FGF의 단독 혹은 혼합투여가 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

1) Fibronectin의 단독 투여가 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

Fibronectin을 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 단독으로 가한 경우 배양 1일째, 치은섬유모세포의 활성화는 0.81 ± 0.09 , 치주인대세포에서는 0.78 ± 0.07 로 나타났다. 배양 2일째에는 치은섬유모세포의 활성화는 0.99 ± 0.18 , 치주인대세포에서는 0.89 ± 0.06 로 나타났다. 배양 3일째에는 치은섬유모세포의 활성화는 1.01 ± 0.02 , 치주인대세포에서는 0.95 ± 0.07 로 나타났다. Fibronectin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서, 배양 1일째 치은섬유모세포의 활성화는 1.03 ± 0.07 , 치주인대세포에서는 0.79 ± 0.07 로 나타났다. 배양 2일째 치은섬유모세포의 활성화는 1.00 ± 0.13 , 치주인대세포에서는 0.93 ± 0.03 로 나타났다. 배양 3일째 치은섬유모세포의 활성화는

Fig 1. Cell attachment of gingival fibroblast & periodontal ligament cell after fibronectin 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ application

(A) : Gingival fibroblasts

(B) : Periodontal ligament cells

1.02 ± 0.12 , 치주인대세포에서는 0.99 ± 0.08 로 나타났다.

Fibronectin 단독 투여군에서는 1일과 2일

Table 1. Cell attachment of gingival fibroblast after fibronectin 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ application

	Control	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
10 min	1.00 ± 0.01	0.90 ± 0.02	0.89 ± 0.09
30 min	1.00 ± 0.07 ¶	0.90 ± 0.02	0.81 ± 0.02 ¶
60 min	1.00 ± 0.01 †	0.92 ± 0.03 †	0.81 ± 0.08 †
90 min	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	0.95 ± 0.01

Mean \pm S.D

(By MTT Assay)

¶, † : Statistically different from control group (P < 0.05)

Table 2. Cell attachment of periodontal ligament cells after fibronectin 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ application

	Control	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
10 min	1.00 \pm 0.05 ¶	0.73 \pm 0.02 ¶	0.81 \pm 0.03 ¶
30 min	1.00 \pm 0.07 †	0.70 \pm 0.03 †	0.87 \pm 0.01 †
60 min	1.00 \pm 0.01 †	0.80 \pm 0.02 †	0.83 \pm 0.01 †
90 min	1.00 \pm 0.01	0.97 \pm 0.02	0.95 \pm 0.02

Mean \pm S.D

(By MTT Assay)

¶, †, † : Statistically different from control group (P < 0.05)

배양기간중에는 대조군 수준에 못미치는 활성을 보였으나 배양기간 3일째에 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성이 대조군수준으로 회복되는 양상을 보였다(Table 3), (Fig 2).

2) FGF의 단독 투여가 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성에 미치는 영향

FGF의 단독투여시 1ng/ml 농도에서는 배양 1일째 치은섬유모세포 대 치주인대세포의 활성이 0.58 \pm 0.21 대 0.98 \pm 0.05, 배양 2일째에는 0.95 \pm 0.21 대 1.21 \pm 0.12, 배양 3일째에는 1.00 \pm

0.02대 1.12 \pm 0.17 이었다. 5ng/ml 농도에서는 배양 1일째에 0.81 \pm 0.18 대 1.00 \pm 0.08, 배양 2일째에는 0.92 \pm 0.08 대 1.23 \pm 0.13, 배양 3일째에는 1.02 \pm 0.21 대 1.21 \pm 0.13이었다. 10ng/ml의 농도에서는 배양 1일째에 0.84 \pm 0.12 대 1.08 \pm 0.09, 배양 2일째에는 0.92 \pm 0.32 대 1.32 \pm 0.07, 배양 3일째에는 1.04 \pm 0.12 대 1.35 \pm 0.21 이었다. 실험군 모두에서 FGF 농도와 시간에 비례하여 활성이 조금씩 높아지는 것을 볼수 있었다(Table 4), (Fig 3).

Table 3. Cellular activities of fibronectin application on gingival fibroblast & periodontal ligament cells after 1st day, 2nd day & 3rd day

	GF			PDL		
	1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
control	1.00 \pm 0.07 ¶	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.05 †	1.00 \pm 0.03 †	1.00 \pm 0.02
20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.81 \pm 0.09 ¶	0.99 \pm 0.18	1.01 \pm 0.02	0.78 \pm 0.07 †	0.89 \pm 0.06 †	0.95 \pm 0.07
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.03 \pm 0.07	1.00 \pm 0.13	1.02 \pm 0.12	0.79 \pm 0.07 †	0.93 \pm 0.03	0.99 \pm 0.08

Mean \pm S.D

(By MTT Assay)

GF : Gingival fibroblast

PDL : Periodontal ligament cells

¶, †, † : Statistically different from control group (P < 0.05)

Fig 2. Cell activities of fibronectin application on gingival fibroblast & periodontal ligament cells
 (A) : Gingival fibroblasts
 (B) : Periodontal ligament cells

Fig 3. Cell activities of FGF application on gingival fibroblast & periodontal ligament cells
 (A) : Gingival fibroblasts
 (B) : Periodontal ligament cells

Table 4. Cellular activities of FGF application on gingival fibroblast & periodontal ligament cells after 1st day, 2nd day & 3rd day

	GF			PDL		
	1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
control	1.00±0.16 †	1.00±0.32	1.00±0.14	1.00±0.14	1.00±0.03 †	1.00±0.22 ¶
1 ng/ml	0.58±0.21 †	0.95±0.10	1.00±0.02	0.98±0.05	1.21±0.12 †	1.12±0.17 ¶
5 ng/ml	0.81±0.18 †	0.92±0.08	1.02±0.21	1.00±0.08	1.23±0.13 †	1.21±0.13 ¶
10 ng/ml	0.84±0.12 †	0.92±0.32	1.04±0.12	1.08±0.09	1.32±0.07 †	1.35±0.21 ¶

Mean ± S.D

(By MTT Assay)

GF : Gingival fibroblast

PDL : Periodontal ligament cells

†, †, ¶ : Statistically different from control group (P < 0.05)

3) Fibronectin과 FGF의 혼합투여가 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

Fibronectin과 FGF의 혼합투여시 각군의 활성도는 Fibronectin 20 μ g/ml + FGF 1 η g/ml의 농도에서 치은섬유모세포 대 치주인대세포가, 배양 1일째 0.97 \pm 0.29 대 0.79 \pm 0.18, 배양 2일째에 1.00 \pm 0.04 대 0.98 \pm 0.12, 배양 3일째에 1.06 \pm 0.12 대 1.07 \pm 0.07 이었다.

Fibronectin 20 μ g/ml + FGF 5 η g/ml의 농도에서는 배양 1일째에는 1.03 \pm 0.22대 1.16 \pm 0.13, 배양 2일째에는 1.07 \pm 0.04 대 1.22 \pm 0.13, 배양 3일째에는 1.04 \pm 0.11 대 1.21 \pm 0.15였다.

Fibronectin 20 μ g/ml + FGF 10 η g/ml의 농도에서는 배양 1일째에는 0.91 \pm 0.07 대 1.30 \pm 0.96, 배양 2일째에는 1.09 \pm 0.01 대 1.32 \pm 0.17, 배양 3일째에는 1.08 \pm 0.02 대 1.35 \pm 0.02였다.

Fibronectin 50 μ g/ml + FGF 10 η g/ml의 농도에서는 배양 1일째에는 0.94 \pm 0.06 대 1.17 \pm 0.08, 배양 2일째에는 1.03 \pm 0.04 대 1.35 \pm 0.05, 배양 3일째에는 1.07 \pm 0.10 대 1.32 \pm 0.21였다.

Fibronectin 50 μ g/ml + FGF 5 η g/ml의 농도에서는 배양 1일째에는 1.02 \pm 0.15 대 1.21 \pm 0.12, 배양 2일째에는 1.03 \pm 0.03 대 1.32 \pm 0.14, 배양 3일째에는 1.05 \pm 0.05 대 1.34 \pm 0.13였다. (Table 5), (Fig 4).

Table 5. Cellular activities of Fibronectin & FGF combined application on gingival fibroblast & periodontal ligament cells after 1st day. 2nd day & 3rd day

	GF			PDL		
	1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
control	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.25 †	1.00 \pm 0.23	1.00 \pm 0.12 †
20 + 1	0.97 \pm 0.29	1.00 \pm 0.04	1.06 \pm 0.12	0.79 \pm 0.18	0.98 \pm 0.12	1.07 \pm 0.07
20 + 5	1.03 \pm 0.22	1.07 \pm 0.04	1.04 \pm 0.11	1.16 \pm 0.13	1.22 \pm 0.13	1.21 \pm 0.15
20 + 10	0.91 \pm 0.07	1.09 \pm 0.01	1.08 \pm 0.02	1.30 \pm 0.06 †	1.32 \pm 0.17	1.35 \pm 0.02 †
50 + 1	0.94 \pm 0.06	1.03 \pm 0.04	1.07 \pm 0.10	1.17 \pm 0.08	1.35 \pm 0.05	1.32 \pm 0.21 †
50 + 5	1.02 \pm 0.15	1.03 \pm 0.03	1.05 \pm 0.05	1.21 \pm 0.12	1.32 \pm 0.14	1.34 \pm 0.13 †
50 + 10	0.90 \pm 0.07	1.07 \pm 0.02	1.09 \pm 0.03	1.17 \pm 0.21	1.38 \pm 0.05	1.42 \pm 0.15 †

(By MTT Assay)

Mean \pm S.D

GF : Gingival fibroblast, PDL : Periodontal ligament cells

20 + 1 : Fibronectin 20 μ g/ml + FGF 1 η g/ml, 20 + 5 : Fibronectin 20 μ g/ml + FGF 5 η g/ml

20 + 10 : Fibronectin 20 μ g/ml + FGF 10 η g/ml, 50 + 1 : Fibronectin 50 μ g/ml + FGF 1 η g/ml

50 + 5 : Fibronectin 50 μ g/ml + FGF 5 η g/ml, 50 + 10 : Fibronectin 50 μ g/ml + FGF 10 η g/ml

†, ‡ : Statistically different from control group (P < 0.05)

Fig 4. Cell activities of fibronectin & FGF combined application on gingival fibroblast & periodontal ligament cells
 (A) : Gingival fibroblasts
 (B) : Periodontal ligament cells

IV. 총괄 및 고찰

치주병소의 치유는 일반적인 창상의 치유와는 다르다. 즉 치주병소의 치유에 있어서 상피 및 치은결체조직의 치근면으로 이주, 증식이 억제되어야만 하며 치주인대세포가 이주, 부착, 증식되어야만 한다. 이러한 치유원칙에서 조절대상이 되는 세포는 치은섬유모세포 및 치주인대세포이다. 치주인대세포는 치은섬유모세포와는 달리 고도로 조직화된 세포 소기관을 갖고 있으며^{28,29)}, 매우 높은 교원질 합성을 보이고³⁰⁾, 조골기능^{31, 32, 33)}과 백악질 생성에 관여하는 기능을 가지고 있다고 알려져 있다.

따라서 이상적인 치유는 치주인대세포가 치근면에 이주, 부착하여 증식되어야만 한다.

이러한 세포의 이주, 부착을 돕는 물질중의 하나가 fibronectin이다.

Fibronectin은 세포와 세포간의 부착을 증진시키고 세포와 세포간질과의 부착을 증진시키는 것으로 밝혀졌을뿐 아니라 섬유모세포 및 간엽세포에 대한 화학주성효과가 있음이 보고되었다^{34, 35, 36, 37)}. 섬유모세포들이 처음 24시간동안에 치근표면에 부착되기 위해서는 치근표면을 향해 이주하여야만 한다. 즉 화학주성이 세포 부착반응에 매우 중요한 역할을 하는것으로 생각되며 이러한 화학주성효과는 노출된 교원섬유나 fibronectin에 의해 일어나며³⁸⁾ 특히 fibronectin은 교원질에 접착하여 화학주성 효과를 나타낸다고 알려져 있다.

Fibronectin 10, 20 μ g/ml을 배양액 속에 직접 첨가한 본 실험에서는 치은섬유모세포와 치주인대세포에서 모든 군에서 세포부착증가의 증거를 볼수 없었다. 또한 fibronectin 20, 50 μ g/ml을 투여한 후 세포의 활성도를 본 실험에서도 대조군 수준을 능가하는 세포의 활성도를 보이지 않았다. 이는 배양액 속에 fibronectin의 직접적인 첨가로 인한 부착되는 세포수의 증가를 볼 수 없었다는 Guy & McQuade등²⁴⁾의 연구결과와 일치한다. 또한 Rompen등²⁵⁾의 치근면에 대한 fibronectin의 처리가 세포부착에 있어 유의한 효과가 없었다는 주장과도 일치한다.

이러한 결과를 바탕으로 fibronectin 자체가 치은섬유모세포나 치주인대세포의 부착 및 활성에 어떠한 영향도 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

그러나 구연산 탈회가 섬유모세포의 부착을 증진시키는 기전에 대한 여러 보고가 있는데 Piatru & Melcher (1983)³⁹⁾는 백악질 표면을 탈회시켜 치근의 교원질이 노출됨으로써 치근 표면에 세포의 이동과 부착이 촉진된다고 하였으며, Ferynhough & Page(1983)⁴⁰⁾는 구연산으로 탈회시키면 섬유모세포들이 잘 함입될수 있는 거친 교원질 표면이 형성된다고 보고하였다. Karp(1989)등⁴¹⁾은 fibronectin의 사용시 섬유모세포의 부착이 비탈회 치근면에서보다 탈회 치근면에서 더 잘 일어난다고 보고했다.

Polypeptide growth factor의 일종인 FGF에 대한 많은 연구가 있었다. Terranova등²⁾은 bFGF가 치주인대세포에 대한 화학주성을 자극한다고 하였다. Blom & Holmstrup등¹²⁾은 FGF의 효과가 0.1~10ng/ml의 농도까지 농도의 존형이라고 하였다. 본 실험에서도 FGF는 1 ng/ml의 농도에서 10ng/ml로 농도가 증가할수록 세포의 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 Terranova등²⁾은 bFGF가 치주인대세포에 대한 효과와 함께 혈관 신생의 잠재성이 성공적인 치유를 야기하며 치주인대세포의 재생을 촉진시킨다고 보고했다. 본 실험에서도 FGF에 대한 치은섬유모세포의 반응은 배양 전기간을 통해 대조군 수준보다 낮거나 비슷한 경향을 보였으며 치주인대세포에서는 배양 3일째 10 ng/ml의 농도에서 대조군의 최대 135%의 활성을 나타내었다.

또한 fibronectin과 FGF를 혼합투여한 경우 본 실험의 결과는 치은섬유모세포에서 1, 2, 3일군 모두 대조군 수준정도의 세포활성을 보였으며 치주인대세포에서는 배양 1일째부터 세포활성의 증가가 나타나기 시작하여 배양 3일째에는 fibronectin 50µg/ml과 FGF 10ng/ml의 농도에서 대조군의 최대 142%의 활성을 나타냈다. 이는 Terranova등²⁾의 bFGF 단독 사용보다 bFGF와 fibronectin의 혼합투여가 치주인대세포에 보다 더 화학주성이 있다고 보고한 결과와 일치한다.

이상의 연구결과를 종합해볼 때, Fibronectin 단독 사용은 섬유모세포의 부착에 영향을 미치지 못하며, 치은섬유모세포나 치주인대세포의 활성에도 어떠한 영향을 미치지 못한다는 것을 알았다. 따라서 구연산이나 다른 치근면 처리제와 fibronectin의 혼합사용이 치주조직의 재생에 필수적인 섬유모세포의 이주, 부착, 증식을 돕는다는 것을 알 수 있다.

또한 FGF나 fibronectin의 혼합투여는 치은 섬유모세포보다는 치주인대세포의 선택적인 화학주성을 유도해 이상적인 치유, 즉 상피나 치은섬유모세포의 배제를 통한 진정한 의미의 치주조직의 재생이 일어날 수 있는 환경을 제공한다. 본 실험에서도 FGF 단독투여와 fib-

ronectin과 FGF 혼합투여시 치주인대세포의 증가된 활성을 볼수 있었고, FGF와 fibronectin의 혼합투여시 치주인대세포의 활성이 FGF 단독 투여시보다 높은 것을 보았다.

본 연구에 사용된 FGF는 실험실적인 연구를 통해 이들이 세포활성 증가에 미치는 영향이 명백해짐으로써 치주조직의 재생을 도모하기 위한 임상적 적용에 있어 더욱 유용해질 것으로 사료된다.

V. 결 론

치주조직의 재생에서 일차적으로 중요한, 치근면으로의 섬유모세포 부착과 연관된 fibronectin의 실험실적 투여가 배양인체 치은섬유모세포와 치주인대세포의 부착에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보고, fibronectin이 단독으로 투여되었을 때와 성장인자의 일종인 FGF 및 fibronectin이 각각 단독 혹은 혼합투여되었을 때 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 시행한 본 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

Fibronectin의 첨가시 치은섬유모세포 및 치주인대세포에서 모두 대조군 수준보다 세포의 부착도가 감소한 결과를 나타내었다. 그러나 시간이 경과할수록 점차 대조군 수준으로 회복되는 경향을 보였다. Fibronectin을 단독투여했을 때는 배양 1일과 2일째에는 대조군 수준에 훨씬 못미치는 활성을 보였으나 3일째에는 치은섬유모세포 및 치주인대세포군 모두 대조군 수준으로 회복되는 경향을 보였다. FGF를 단독 투여하였을 경우, 치은섬유모세포군에서는 배양 전기간을 통해 대조군 수준에 못미치는 활성을 보였고 치주인대세포군에서는 배양 2일과 3일째에 치은섬유모세포군에 비해 유의한 활성증가를 보였다. Fibronectin과 FGF의 혼합투여시에는 치은섬유모세포군에서는 배양전기간을 통해 대조군 수준의 활성을 보인 반면 치주인대세포군에서는 배양 2일과 3일째에 유의한 세포활성의 증가를 보였다.

이상과 같은 연구결과를 바탕으로, Fibronectin 단독 사용은 섬유모세포의 부착에 영향을

미치지 못하며, 치은섬유모세포나 치주인대세포의 활성화에도 어떠한 영향을 미치지 못한다는 것을 알았다. 또한 FGF나 fibronectin의 혼합투여는 치은섬유모세포보다는 치주인대세포의 선택적인 화학주성을 유도해 이상적인 치유 즉, 상피나 치은섬유모세포의 배제를 통한 진정한 의미의 치주조직의 재생이 일어날수 있는 환경을 제공해 줄 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bogle,G., Adams,D., Crigger,M., Linge,B., and Egelberg,T. : New attachment after surgical treatment and acid conditions of roots in naturally occurring periodontal disease in dogs. *J.Periodont.Res.* 16 : 130-133, 1981.
2. Bowers,G.M, Scallhom,R.G. & Mellonig,J. T. : Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review *J.Periodontol.* 53 : 509-514 1982.
3. Cole,R, and Egelberg,J. : Pilot studies on the effect of topical citric acid applicatrion on healing after replaced periodontal flap surgery. *J.Periodont.Res.* 16 : 117-121, 1981.
4. Dragoo,M.R. & Sullivan,H.C. : A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans : Part I. Wound healing 2 to 8 months. *J.Periodontol.* 44 : 599-613, 1973.
5. Hiatt,W.H., Schallhom,R.G. & Aaronian,A. J. : The induction of new bone and cementum formation. *J.Periodontol.* 49 : 495-512, 1978.
6. Listgarten,M.A. & Rosenberg,M. M. : Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J.Periodontol.* 50 : 333-344, 1979.
7. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, et al. : New attachment formation in human periodontium by guided tissue regeneration. *J Cin Periodontol.* 13 : 604-612, 1985.
8. Karring T, Nyman S, Lindhe J. : Proteins for root resorption during periodontal wound healing. *J Clin Periodontol.* 11 : 41-52, 1984.
9. Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. : New attachment formation on the teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Cin Periodontol.* 12 : 51-60, 1985.
10. Thomas W. Oates, Cheryl A. Rouse, and David L. Cochran : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J.Periodontol/* 64 : 142-148, 1993.
11. David K. Dennison, Dominic R. Vallone, Gerald J. Pinero, Barry Rittman, and Raul G. Caffese : Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* 65 : 641-648, 1994.
12. Søren Blom, Palle Holmstrup, and Erik Dabelsteen : A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cell's DNA synthesis and morphology. *J.Periodontol.* 65 : 373-378, 1994.
13. William V. Giannobile, Richard D. Finkelman, and Samule E. Lynch : Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regeneration therapy : Results following a single administration of PDGF/IGF-1. *J.Periodontol.* 65 : 1158-1168, 1994.
14. N.Matsuda, W.L.Lin, N.M.Kamar, M.I. Cho, and R.J.Genco : Mitogenic, chemotactic, and synthetic response of rat periodontal ligament fibroblastic cells to po-

- lypeptide growth factors in vitro : J.Periodontol. 63 : 515–525, 1992.
15. Lynch SE, Williams RC, Rolson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antonia-des HN : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regenerations. J Cin Periodontol 16 : 545–548 : 1989.
 16. Morrison PR, Edsall JT, Miller SG. : Preparaion and properties of serum and plasma proteins. X VIII. : The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. J Am Chem Soc. 70 : 3103–3108, 1948.
 17. Gahmberg CG, Hakomori SI. : altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid. Proc Natl Acad Sci USA. 70 : 3329–3333, 1973.
 18. Quaroni A, Isselbacher KJ, Ruoslathi E. : Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine. Proc Natl Acad Sci USA. 75 : 5548–5552, 1978.
 19. Birdwell CR, Gospodarowicz D, Nicholson GL. : Identification, localization and role of fibronectin in cultured bovine endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA. 75 : 3273–3277, 1978.
 20. Baum BJ, Wright WE. : Demonstration of fibronectin as a major extracellular protein of human gingival fibroblasts. J Dent Res. 59 : 631–637, 1980.
 21. Terranova VP, odziemiec C, Tweden KS, Spadone DP. : Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. : Effect of basic fibroblast growth factor. J. Periodontol. 60 : 293–301, 1989.
 22. Raul G, Caffese & Carols R. Quinones : Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound helaing and regeneration. Periodontology 2000 1 : 69–79, 1993.
 23. Wirthlin MR. : The current status of new attachment therapy. J.Periodontol. 52 : 529, 1981.
 24. S.C.Guy, M.J.MvQuade, M.J. Scheidt, J.C. McPhersonIII, J.A. Rossmann, and T.E. Van Dyke : In vitro attachment of human gingival fibroblasts to endosseous implant materials. J.Periodontol. 64 : 542–546, 1993.
 25. E.H.Rompen, J.Kohl, B.Nusgens, and C. M/Lapiere : Kinetic aspects of gingival and periodontal ligament fibroblast attachment to surface-conditioned dentin. J. Dent.Res. 72(3) : 607–612, 1993.
 26. Dana T.Graves. and David L. Cochran. : periodontal regeneration with polypeptide growth factors. Current Opinion in Periodontology. 178–186, 1994.
 27. Esch F, Baird A, Ling N et al. : Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison of bovine brain acidic FGF. Proc Natl Acad Sci USA. 82 : 6507–6511, 1985.
 28. Cho MI., Garant PR. : Sequential events in the formation of collagen secretion granules with special reference to the development of segment-long-spacing like aggregates. Ana Rec 199 : 309–320, 1981.
 29. Cho MI., McCarthy PR. : Role of microtubules in the organization of the Golgi complex and the secretion of collagen secretory granules by periodontal ligament fibroblasts. Anat Rec 199 : 459–471, 1981.
 30. Sodek J, Berkman FA. : Bone cell cultures. In : methods in enzymology, vol 145, Academic Press ; 303–324, 1987.
 31. Nojinma N, Kobayashi M, Shiionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K. : Fibroblastic cells derived from bovine perio-

- dontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J.Periodont Res* 25 : 179-185, 1990.
32. Topham RT, Chieco DJ Jr, Gattone VH, Hinton DA, Klein RM. : The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dav Biol* 124 : 532-543, 1987.
 33. Yamashita Y, Sato M, Noguchi T. : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch Oral Biol* 32 : 677-678, 1987.
 34. Kleinman H.K. : Interactions between connective matrix macromolecules. *Connect. Tissue.Res.* 10 : 61-72, 1982.
 35. Kleinman H.K., Klebe R.J., and Maritin G.R. : Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J.Cell Biol.* 88 : 473-485, 1981.
 36. Mensing H,Pontz B.F., Muller P.K., and Gauss-Muller, V. : A study on fibroblast chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants. *Eur. J. Cell Biol.*, 29 : 268-273, 1983.
 37. Terranova VP, Franzetti, LC., Hic S., and Wikesjo, UM. : Biochemically mediated periodontal regeneration. *J.Periodont. Res.* 22 : 248-251, 1987.
 38. Postlethwatie A.E., Seyer J.M., & Kang A.H. : Chemotactic attraction of human fibroblast for type I, II, and III collagens and collagens derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 : 871-875, 1978.
 39. Piatru S., & Melcher A.H. : Orientation of gingival fibroblasts and newly-synthesized collagen fibers in vitro : Resemblance to transeptal and dentogingival fibers. *J.Periodont.Res.*, 18 : 483-500, 1983.
 40. Ferynhough, W.S. & Page, R.C. : Attachment growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin treated normal and diseased tooth roots. *J.Periodontol.*, 54 : 133-139, 1983.
 41. Karp, W., Sodek, J., Aubin, J.E., and Melcher, A.H. : A comparison of fibronectin and laminin binding to undemineralized and demineralized tooth root surfaces. *J. Peridont.Res.*, 21 : 30-38, 1986.

THE EFFECTS OF FIBRONECTIN & GROWTH FACTOR ALONE OR COMBINED APPLICATION ON THE ACTIVITY OF GHUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS AND PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Eung-Tae Kim, Du-Seok, Han, Hyung-Keun, Yoo, Hyung-Shik, Shin

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

The selective migration, attachment and proliferation of periodontal ligament cells are the desired goal of periodontal regeneration therapy. Fibronectin is well known for an attachment protein for dentin surface. Also, Fibroblast growth factor (FGF) is well known to enhance the periodontal regeneration. The purpose of this study was to evaluation the effect of fibronectin and FGF on the attachment rate and the cellular activity.

Human gingival fibroblast and periodontal ligament cells were cultured from the teeth extracted for non-periodontal reson. Cultured human gingival fibroblast and periodontal ligament cells in vitro were treated with fibronectin and FGF a various dosage and culture times. Cellular activity was examined by MTT assay.

The results of this study was demonstrated that cell attachment rate of experimental group was under the control value at 1st, 2nd, 3rd incubation day. But, at 3rd incubation day, attachment value tended to return to the control value. In case of fibronectin alone application, cellular activity was decreased than that of control at 1st, 2nd incubation day. But 3rd day, cellular activity was returned to the control value. The activity of gingival fibroblast in FGF alone application was decreased than that of control at each incubation day. But activity of periodontal cell group was increased cell activities at 2nd, 3rd day. Additionally cellular activity of fibronectin & FGF combined application on gingival fibroblast group was similar to control value at incubation day. But activity of periodontal ligament cell group was increased at 2nd, 3rd day compared with control group.

This study demonstrated that combined application of fibronectin & FGF induced the selective chemotaxis for periodontal ligament cell in vitro.