

Bone Morphogenetic Protein(BMP)이 인체 치주인대 세포의 활성에 미치는 효과

이성진 · 윤형진 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주염은 치은 염증과 치아 주위의 지지 치조골과 결합조직의 상실을 동반한 치주낭 형성으로 특징 지워진다¹⁾. 이러한 치주염의 치료 양식은 치은 염증 과정의 해소와 치주질환의 진행을 예방하는 것뿐만 아니라 질환으로 인해 상실된 치주조직을 재확립시키거나 재생시키는데 목적을 두고 있다. 그러나 치주조직의 치유에 대한 연구는, 전통적인 치주치료가 재생의 결과보다는 회복의 결과를 초래한다고 보고하고 있다^{2,3)}. 이러한 회복의 개념은 통상 치은 결합조직과 치근면 사이의 치은 상피의 근단부 이동으로 설명된다. 이러한 상피의 개재는 노출된 치근의 치주인대 세포의 부착을 방해하고 따라서 치주조직의 재생을 방해한다. 치주조직의 재생은 상피 세포, 골아 세포, 치주인대 세포, 치은 결합조직의 섬유 모세포를 포함하는 다양한 세포들에 의해 이루어지기 때문에 매우 복잡하다.

치주조직의 재생에서 치주인대세포에 초점이 맞추어지는 이유는, 이 세포가 풍부한 세포외 기질 합성을 갖는 고도로 조직화된 세포내 기관을 가진 세포극성을 가지고 있으며^{33,34)}, 또한 매우 높은 교원질 합성율을 보이고 신생 교원질 분자의 증합에 가장 효과적이며³⁵⁾, 조골 기능을 가지며³⁶⁻³⁸⁾, 백악질 생성에 관여하는 기능을 갖는다고 알려져 있기 때문이다. 치주적인 재

생이 일어나기 위해서는 치주인대의 전구 세포가 노출된 치근면에 이주되어야 하고, 부착되어야 하며, 조직화되고 기능적인 섬유성 부착기구내로 증식되고 성숙되어야 한다. 이와 유사한 방법으로 골세포의 전구 세포 또한 재생 중인 치주인대세포와 연결하여 이주, 증식, 성숙되어야만 한다.

지난 수십 년간 이러한 일련의 사건들을 조절하는 요소, 즉 성장 인자라고 알려진 물질들에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다¹⁰⁻¹⁵⁾. 이러한 성장인자중 치주조직의 치유에 영향을 주는 대표적인 인자로서, platelet derived growth factor(PDGF), transforming growth factor(TGF), fibroblast growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF), epidermal growth factor(EGF)와 bone morphogenetic protein(BMP)등이 있다. 조직의 치유와 관계된 이러한 인자들은 화학주성, 증식, 분화와 세포외 기질 단백질의 생성을 포함하는 다양한 역할을 가지고 있다¹⁶⁾.

이중 bone morphogenetic protein(BMP)은, 실험실상 정제되고 특정화된 몇 개의 단백질로 표현된다. BMP는 BMP-1, BMP-2(BMP2A¹⁷⁾), BMP-3(osteogenin¹⁸⁾), BMP-4(BMP-2B¹⁷⁾), BMP-5, BMP-6(Vgr-1¹⁹⁾) 및 BMP-7(OP-1^{20,21)})로 분류된다^{17,22)}. BMP-2에서 BMP-7까지는 구조적으로 TGF- β 와 관련이 있으나^{17,19,20,22)}, BMP처럼 작용하지는 않는다. 예를 들면

BMP는 골 형성을 자극할 수 있으나, TGF- β 는 미성숙 간엽세포를 자극함에 의해 골 형성을 자극할 수 없으므로 기능적으로 다른 것이다. Yamaguchi 등²³⁾은 모든 성장 인자가 인체 내에서 생산되고 분비되듯이 BMP도 골아 세포에 의해 생산되고 골에 저장되며, 그중 BMP-2는 골 기질 단백질을 형성하는 능력과 더불어 골아 세포의 분화를 유도한다고 보고하였다. 그러나 이러한 인자들의 정제상의 어려움과 실험관내 검체체계의 결여로 인해 골 유도 인자의 구성 요소와 그의 작용 기전은 아직까지도 불투명하게 남아 있다.

그러나 치주인대세포에 대한 이런 단백질의 직접적인 활성은 광범위하게 연구되지 못했다. 반면, 생체상에서 그들의 생물학적인 활성에 대해서는 여러 선행들의 연구가 있었다^{17, 18, 21, 24, 25, 27)}. Toriumi 등²⁷⁾은 BMP가 하악골 결손부에서 골의 회복을 증가시킨다고 보고했다. Ripamonti 등²⁸⁾은 골 재생에서 다른 기질을 흡수하는 BMP-3의 효과에 관한 연구에서, 대조군에 비해 BMP-3으로 치료된 군에서 더 많은 골생성이 일어난 것을 보고했다. 한편 Bower 등²⁹⁾은 치주조직의 재생에 관한 BMP-3의 효과에 관한 연구에서, DFDBA(demineralized freeze dried bone allografts) 혹은 bovine tendon-derived matrix와 혼합된 osteogenin은 인간에서 골내 치주결손부의 재생 능력을 유의하게 증진시킨다고 주장했다.

Yamaguchi 등²³⁾은 쥐에서 분리한 골아세포 2종을 이용하여 BMP의 효과를 보기 위한 연구를 시행하였는데, 이 연구에서 골아세포 전구 단계에 있는 세포에 BMP를 투여하였을 때 alkaline phosphatase(ALP) 활성이 더 높아졌다고 보고했다. 본 연구에서도 BMP에 대한 치주인대세포의 골 형성 능력을 평가하기 위해 ALP 활성을 조사했다.

ALP는 막에 부착하는 효소³⁰⁾로서 골 형성과 석회화에서 중요성이 강조되고 있다^{31, 32)}. Krzyzstof 등³³⁾의 연구 결과에 의하면 골 형성 능력을 가진 세포에서는 ALP 활성이 높은 반면, 골 형성 능력이 없는 세포에서는 ALP 활성이 낮다고 보고했다. 즉 ALP가 골 형성 능력을 가진

세포에 대한 표식자로 유용하다고 주장했다.

이러한 선행들의 연구 결과를 근거로 본 연구는, 치주조직의 재생에서 연구의 대상이 되고 있는 치주인대세포에 BMP를 투여하였을 때 세포의 활성이 어느 정도로 영향을 받는지를 알아보며, ALP 활성을 통해 BMP가 치주인대세포에 작용하여 어느 정도 골 형성 능력을 가지는지를 평가할 목적으로 시행되었다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 치주인대세포의 준비

본 연구에 사용된 치주인대 세포는 교정 목적으로 발치한 소구치나 제 3 대구치에서 얻어졌다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태는 임상 및 방사선학적으로 평가되었다. 발치한 치아의 치근의 중간 1/3에서 절제한 치주인대조직은 40% 우태아 혈청(Fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 20% 항생제(Penicillin G, Streptomycin, Amphotericin B 포함, Gibco Co., USA)를 가한 α -MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co., USA)으로 3회 세척하였다. 치주인대 조직을 세척한 후 60 mm 세포 배양용 배양 접시(Nunc Co., USA)로 옮겨 약 1mm²로 세척하였다. 세척한 조직은 20분간 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기(Bantex 1820 IR, SHELL-LAB, USA)에서 배양 접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 2ml의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 포함한 α -MEM을 가하고 단일세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 3일간 배양 후 배양접시내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution, Gibco Co., USA)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한 후 0.25% Trypsin/EDTA(10%, Gibco Co., USA)를 배양접시당 2 ml씩 넣고 3분간 원심 분리용 시험관으로 옮겨 1,200 rpm으로 10분간 원침하였다. 원침 후 상청액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한 후 Vortex mixer로 혼합하고 세포 부유액을 만들어 60 mm

배양 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2 혹은 3일 간격으로 교환하였다. 본 실험에서는 4회 내지 5회 계대 배양한 치주인대세포를 이용하였다.

2) BMP의 준비

도축한지 24시간이 지나지 않은 소(Juvenile Bovine)에서 사지 골만을 선택하여 골단부를 잘라내고 골체부의 연조직 및 골수를 기계적으로 긁어낸 다음, 피질골만을 액화 질소로 동결시켰다. 공작소에서 주문 제작한 쇠질구와 격자 간격 1.5 mm 인 분석용 체를 이용하여 약 2.4 Kg의 골 분말을 준비하였다. 골 분쇄시 작업의 용이와 열 발생을 막기 위해 액화 질소와 dry-ice를 이용하였다. 골 분말 600g 당 8 L의 CH 용액(Choroform : methanol=1 : 1)으로 상온에서 24시간 탈지한 후 클로로포름 냄새가 나지 않을 때까지 골 분말을 건조시켰다. 탈지때와 동일한 용량의 0.6 N HCl로 24시간 동안 탈회하며(실온), 12시간째 새로운 HCl로 갈아주었다. 탈회가 끝난 후 차가운 증류수로 15분간 3번 이상 세척하여 pH 4 이상이 되면, 분석용 체(격자 간격 0.1 mm)에 담아 물기를 가능한 많이 제거한 후 동결 건조시켰다. 이렇게 준비된 탈회골 기질 80g당 1.6 L의 0.1 M Tris-HCl+0.01 M EDTA+5mM MEM(N-ethylmaleimide)+5 mM Iodoacetic acid(pH 8) 용액으로 28℃ 2시간동안 항온 하여 endogenous protease를 억제시켰다. 항온 처리된 골 기질을 1.6 L의 guanidine 용액(4M Gu-HCl, 0.1 M Tris-HCl, 0.01M EDTA, pH 7, 5mM IAA, 2mM PMSF)으로 28℃에서 12시간 동안 단백질을 일차 추출하고 다시 새로운 guanidine 용액으로 이차 추출하였다. 일, 이차 추출액을 원심 분리하여(3,800 rpm, 4℃ 30분) 상청액을 투석 bag(Spectra/Por 3 Membrane, MWCO 3,500)에 담고 차가운 증류수로 60시간 동안 투석했다. 투석된 시료를 다시 원심 분리하여(3,800 rpm, 4℃ 30분) 상청액을 따라 버린 다음 침전물을 동결 건조하였다(P1 BMP). 상기의 P1-BMP 3g을 50mM Tris-HCL, 6M Urea, 0.15M NaCl, pH 7의 충분히 탈기(de-gassing)된 용매 300 ml에 2시간동안 녹인 다음

원심 분리하여(3,800 rpm, 4℃ 30분) 상청액을 Heparin-Sepharose CL-6B(Pharmacia, Sweden)로 충전된 크로마토그래피 column에(Internal diameter×Height : 50×12.5 mm, V+270 ml) 1.5 ml/min 의 속도로 loading 했다. 시료의 loading에 이어 300ml의 50 mM Tris-HCL, 6M Urea, 0.5 M NaCl, pH 7 용액으로 gel affinity를 reverse 시켰다.

Heparin-Sepharose gel 에 공유 결합되지 않은 추출액은 버리고, gel이 reverse되면서 빠져나온 약 200 ml을 모은, 이 용액에 NEM 0.125 g을 첨가한 다음 투석 동결 건조하여 P2-BMP(osteogenin)을 얻었다. 상기의 P2-BMP를 Sephacryl S-200HR로 더욱 fractionation 하고 각 fraction을 다시 투석 동결 건조하여 P3-BMP를 얻었다. 이렇게 얻은 BMP를 6M Urea로 다시 녹여 실험에 사용하기 위한 농도인 10, 100, 300, 500, 700, 1000 ng/ml의 농도로 농축액을 만들었다.

2. 연구 방법

1) MTT assay를 이용한 세포의 활성도 평가

실험 전일 24 well plate에 분주한 치주인대 세포에 BMP를 10, 100, 300, 500, 700, 1000 ng/ml 농도로 가하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였다.

각군의 세포 활성을 보기 위해 식염수에 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA) 용액 50 µl를 각 well에 넣고 3시간 동안 배양후 MTT 용액을 버리고, DMSO를 50 µl씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해 시킨 후 세포 활성도의 측정을 위해 96 well plate 상으로 옮겼다. Plate 를 잘 흔든후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Tokyo, Japan)에 plate 를 넣은 다음 630 nm 를 기준으로 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 각 군마다 4배수로 시행하였으며, 매 실험마다 실험 용액이 들어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 모든 실험 결과는 다음과 같이 대조군의 백분율로 산출

하였다.

세포 활성도(%) = 실험 well의 흡광도 / 대조 well의 흡광도 × 100

2) ALP의 활성을 이용한 세포의 활성도 평가

각군의 ALP 활성을 보기 위해 배양된 세포를 trypsin 처리하여 그 수를 측정한 후에 96 well-plate에 각 well 당 10,000개의 세포를 접종한 후 10% FBS가 함유된 200 μ l DMEM과 BMP를 10, 100, 300, 500, 700, 1000 ng/ml 농도로 가하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 각 well 당 1% triton X-100 50 μ l를 첨가하여 30분간 가볍게 흔들어 줌으로써 세포를 용해 시켰다. 용해된 세포의 ALP 활성도 측정은 페닐 인산올 기질로 사용하여 알칼리성 용액에서 세포 용해액과 30분간 반응 시킨 후 이때 유리된 페놀을 비색정량하는 방법을 이용하였다. 이때 반응 산물의 적정 density는 400 nm에서 읽어졌다. 효소 활성의 one unit는 37 $^{\circ}$ C 배양에서 30분간 기질 1 mol을 수화시키는데 요구되는 최소의 효소 양으로 정의되었다. 결과는 U/mg protein으로 표현되었다.

3) 통계분석

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분

율로 환산된 세포활성의 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적인 유의성은 일원분산 분석법(ANOVA)과 Duncan's multiple range test 를 이용하여 통계분석하였다.

III. 결 과

1. BMP가 배양 인체 치주인대세포의 활성에 미치는 영향

치주인대세포의 활성을 검사하기 위해, 상기농도의 BMP를 배양인체 치주인대세포에 투여한 결과 배양 1일째 대조군에 비해 BMP 10 ng/ml에서 최대 146.78 \pm 7.45의 활성을 보였으며, 전군 모두에서 유의한 세포활성의 증가가 나타났다(P<0.05).

배양 2일째에는 대조군에 비해 최대활성은 BMP 300 ng/ml에서 148.15 \pm 4.78의 활성을 보였으며, 역시 전군 모두에서 통계학적으로 유의성이 있게 활성도가 증가했다(P<0.05).

한편 배양 3일째에도 역시 BMP 10 ng/ml의 농도에서 대조군의 최대 145.72 \pm 3.51의 활성을 보였으며, 전군 모두 통계학적으로 유의성 있는 세포활성의 증가를 보였다(P<0.05)(Table 1) (Fig. 1).

Table 1. Cellular activities of BMP on Periodontal Ligament Cells at 1st, 2nd and 3rd day (% By MTT Assay)

Dose Day	Control	10 ng/ml	100 ng/ml	300 ng/ml	500 ng/ml	700 ng/ml	1000 ng/ml
1st day	*100.00 \pm 2.03	146.78 \pm 7.45 †	138.87 \pm 11.24 †	136.49 \pm 3.80 †	135.19 \pm 6.08 †	139.86 \pm 11.54 †	130.89 \pm 3.15 †
2nd day	100.00 \pm 3.80	139.54 \pm 18.08 †	137.72 \pm 12.07 †	148.15 \pm 4.78 †	142.79 \pm 5.80 †	139.54 \pm 8.08 †	140.15 \pm 2.61 †
3rd day	100.00 \pm 5.47	145.72 \pm 3.51 †	132.86 \pm 4.85 †	128.44 \pm 7.77 †	130.99 \pm 4.26 †	124.87 \pm 11.13 †	124.03 \pm 6.54 †

*Mean \pm S.D

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

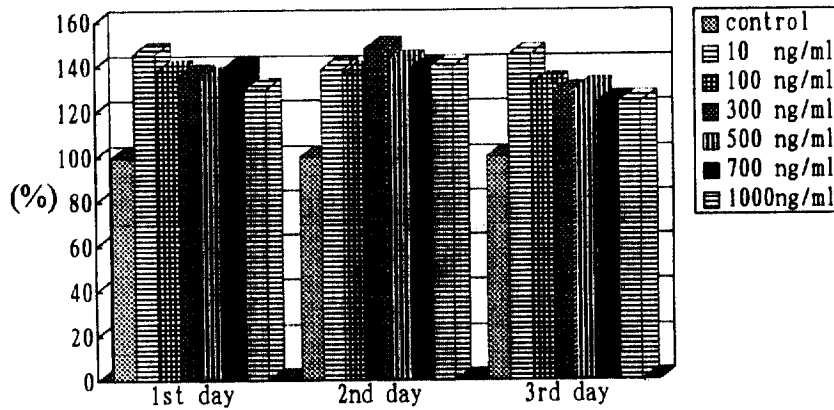


Fig.1 Cellular activities of BMP application on periodontal Ligament Cells at 1st, 2nd and 3rd day (% by MTT assay)

2. BMP가 배양인체 치주인대세포의 ALP 활성에 미치는 영향

상기농도의 BMP를 배양인체 치주인대세포에 가했을 때 배양 1일군에서의 ALP활성은 대조군 3.50 ± 0.58 에 비교해 1000 ng/ml에서 최대 6.25 ± 0.50 의 활성도를 보였다(대조군의 178.57%의 활성). 그리고 100, 300 ng/ml에서는 각각 5.25 ± 0.50 , 5.00 ± 0.82 의 통계학적으로 유의성 있는 활성의 증가를 보였다(각각 대조군의 150.00, 142.86 %)($P < 0.05$).

배양 2일째에는 대조군이 3.25 ± 0.50 의 활성을 보였고, BMP 1000 ng/ml에서 최대 7.25 ± 2.21 (대조군의 223.08%)의 활성증가를 보

였다. 또한 500, 700 ng/ml의 농도에서도 각각 7.00 ± 2.58 , 7.00 ± 2.58 (각각 대조군의 215.39%)의 통계학적으로 유의성 있는 활성의 증가를 보였다 ($P < 0.05$).

배양 3일째에는 대조군이 2.75 ± 0.96 의 활성을 보였고, BMP 1000ng/ml의 농도에서 대조군의 최대 8.75 ± 2.06 (대조군의 318.19%)의 활성 증가를 나타냈다. 그리고 500, 700 ng/ml의 농도에서 각각 6.25 ± 1.71 , 6.00 ± 1.41 (대조군의 각각 227.27, 218.43%)의 통계학적으로 유의한 활성의 증가를 보였다($P < 0.05$)(Table 2)(Fig. 2, 3).

Table 2. ALP activities of BMP on Periodontal Ligament Cells at 1st, 2nd and 3rd day (U/mg protein)

Dose / Day	Control	10 ng/ml	100 ng/ml	300 ng/ml	500 ng/ml	700 ng/ml	1000 ng/ml
1st day	* 3.50 ± 0.58 (100.00)	4.00 ± 0.82 (114.29)	5.25 ± 0.50 (150.00) †	5.00 ± 0.82 (142.86) †	4.25 ± 0.50 (121.43)	4.25 ± 0.50 (121.43)	6.25 ± 0.50 (178.57) †
2nd day	3.25 ± 0.50 (100.00)	4.00 ± 0.82 (123.08)	4.50 ± 0.58 (138.65)	4.00 ± 1.41 (123.08)	7.00 ± 2.58 (215.39) †	7.00 ± 2.58 (215.39) †	7.25 ± 2.21 (223.08) †
3rd day	2.75 ± 0.96 (100.00)	5.00 ± 0.82 (181.82)	4.75 ± 1.71 (172.73)	4.00 ± 0.82 (145.46)	6.25 ± 1.71 (227.27) †	6.00 ± 1.41 (218.43) †	8.75 ± 2.06 (318.19) †

*Mean \pm S.D (% Compared with control group)

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

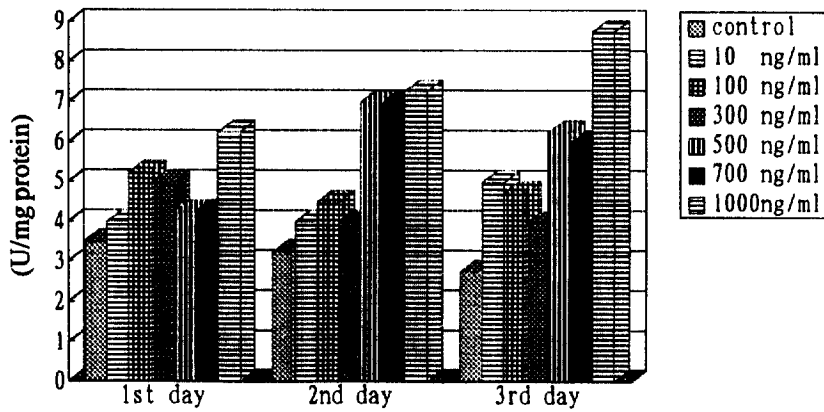


Fig 2. ALP activities of BMP application on periodontal Ligament Cells at 1st, 2nd and 3rd day

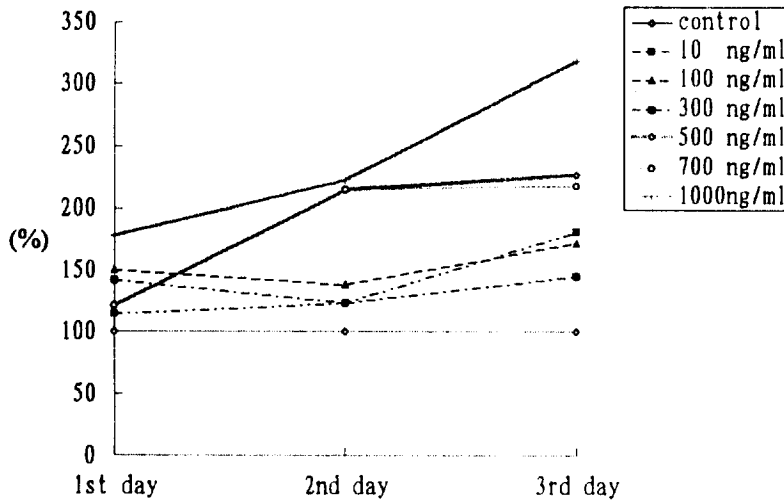


Fig 3. ALP activities of BMP application on periodontal Ligament Cells at 1st, 2nd and 3rd day (% by control group)

IV. 총괄 및 고찰

치주치료의 목적은 신생 결합조직과 백악질을 형성하고 질환에 이환된 치면에 교원섬유가 부착하여 상실된 치주조직을 재생하는데 있다. 이러한 재생과정에는 염증조직의 제거, 섬유모세포의 이주와 증식, 교원질 섬유의 합성, 신생 백악질과 골의 형성, 교원질 섬유의 치면 부착등이 요구된다. 그러나 염증조직 제거후에 치유부에 이주해온 세포들의 성장에 따라 치

유양상이 다르게 나타난다. 치은결체조직에서 유래된 세포는 치아의 재부착을 촉진 시키지 못하고, 치근흡수를 야기하는 반면³⁴⁾, Nyman 등³⁵⁻³⁸⁾은 치주인대에서 유래된 세포는 이환된 치근면에 신생백악질을 형성하고 교원질 섬유가 매몰됨으로써 신부착을 가능하게 하였다고 보고하였다. 이러한 점으로 미루어 보아 치주인대세포는 치은결체조직세포와는 달리 골형성 능력이 있는 세포들이 잔재해 있을 것으로 생각된다. Gould^{39,40)}, McCulloch⁴¹⁾ 및 Davidson

과 McCulloch⁴²⁾는 치주인대 조직내의 혈관 주변에 미분화된 전구세포를 관찰할 수 있다고 보고하였고, Aukhi 등⁴³⁾은 치주인대내에 있는 전구세포는 치아의 상아질과 백악아세포와 같은 재생능력이 있는 세포로 분화한다고 하였고, McCulloch 등⁴⁴⁾은 [³H-thymidine]을 이용한 자가 방사능법 실험에서 치주인대내에 존재하는 조골세포와 백악아세포의 전구세포중 적어도 일부는 골내강에서 유래하여 치주인대내로 이주해간다고 보고하였다. 이와 같은 연구결과를 바탕으로 본 실험에서는 3-5회 계대배양한 치주인대세포를 이용하였다. 최근에 골의 생성과 치주조직의 재생을 증진시키려는 시도로서 성장인자를 사용한 연구결과들이 발표되었다¹⁶⁾.

Rutherford 등⁴⁵⁾은 부분적으로 정제된 osteogenic protein을 bone collagen matrix와 혼합하여 3마리의 원숭이에서 골 유도 효과를 평가하였는데, 3주내에 신생골을 형성할 수 있다고 보고했다. Reddi 등^{31,46)}은 재조합 BMP-2가 간엽세포에서 골아세포로의 분화를 자극하고, 재조합 BMP-2에 의해 유도된 ectopic bone formation 과정에서 골아세포 분화후에 연골형성이 일어난다는 것을 보고했다. 또한 Reddi³¹⁾와 Nyman⁴⁷⁾, Gottlow⁴⁸⁾는 demineralized bone matrix에 bone inducing factor가 함유된 기질의 매식에 의해 근육내에서 ectopic bone formation이 일어난다고 주장하였다. 생체상 골형성을 유도했다는 연구가 많았던 반면, 실험실상 배양된 세포에 대한 BMP의 연구는 별로 없었다. Yamaguchi 등²³⁾은 그들의 연구에서 좀더 분화된 골아세포에서보다 덜분화된 골아세포에서 ALP 활성이 높다고 보고하였다. 이 연구에서, BMP는 1 μ l에서 활성이 있다고 하였는데, 이것은 세포에 영향을 미치기 위한 다른 cytokine이나 성장인자의 용량보다 매우 크다. 이러한 관계는 BMP의 낮은 활성때문이 아니라, 자연발생적인 BMP와 재조합 BMP의 차이로 설명될 것이다. 왜냐하면 자연발생적인 BMP보다 재조합 BMP가 같은 ectopic bone formation을 얻기 위해 더 많은 양이 필요하기 때문이다²⁶⁾. 한편 Hiraki 등⁴⁹⁾은 그들의 연구에서, 쥐에서 분리해낸 골아세포에 대해, 고도로

정제된 BMP-2와 BMP-3의 효과를 TGF- β 와 비교하였다. 이 연구의 결과는 BMP-2와 BMP-3의 혼합이 FGF의 존재하에 골아세포의 DNA 합성을 유의하게 자극했고, BMPs는 성장시기에서 연골아세포의 빠른 성숙을 유도했다고 보고했다.

본 연구에서는 세포의 활성 평가방법으로 ALP 활성도를 이용했다. ALP는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로서 정확한 기능은 알려져 있지 않지만, Robinson⁵⁰⁾은 유기인산에서 무기인산을 분리해낼수 있는 효소라고 보고하였으며, Siffert⁵¹⁾는 골형성 이전의 세포대사와 칼슘과 인 이온이 결정화 되기 이전의 골 기질 형성에 주로 관여한다고 보고하였다. 또한 ALP는 골아세포의 plasma membrane과⁵²⁾, calcifying cartilage의 세포의 matrix vesicle에 고농도로 존재한다⁵³⁾. 본 연구에서는 BMP를 실험실적으로 배양된 치주인대세포에 투여하였는데, MTT 분석 결과 전군 모두에서 대조군에 비해 유의성 있는 활성 증가를 보였다(p<0.05). 이와 같은 결과는 본 실험에 사용한 BMP가 치주인대세포 자체에 독성이 없다는 것을 증명해준다.

ALP활성을 이용한 결과는 1000 ng/ml의 농도에서 배양 3일째 대조군의 최대 318.19 %의 증가를 보였고 배양 기간에 관계없이 500 ng/ml 이상의 농도에서 유의한 활성의 증가를 볼수 있었다. 이러한 양상은 시간의존적으로 보였다. 이 결과는 BMP를 3일간 처리한 결과가 대조군에 비해 ALP활성이 2배 상승했고, 6일째의 활성은 대조군의 16배의 상승을 보였다는 Yamaguchi 등²³⁾의 결과와 일치한다. 또한 Vukicevic 등⁵⁴⁾의 BMP-3가 쥐의 골아세포에서 [³H-Thymidine]의 incorporation과 ALP 활성을 증진시킨다고 보고한 결과와도 일치하며, 좀더 분화된 골아세포에서보다 덜분화된 골아세포에서 ALP 활성이 높다고 보고한 Akira 등²⁵⁾의 연구 결과와도 일치한다.

본 연구결과에서도 나타났듯이, BMP가 치주인대세포의 ALP활성에 미치는 영향이 병백해졌다. 위에서도 언급되었듯이 유의하게 증가한 ALP 활성을 나타내기 위해서 BMP는 1

μl 이 필요하며, 이것은 세포에 영향을 미치기 위한 다른 cytokine이나 성장인자의 용량보다 매우 크다. 이런 관계는 자연발생적인 BMP와 재조합 BMP의 차이 때문이다.

앞으로의 연구는 같은 효과를 얻기 위해 필요한 자연발생적인 BMP와 재조합 BMP 사이의 양적인 차이를 해명하기 위한 연구가 필요하며, 과연 치주조직의 재생을 위한 BMP의 적절한 농도, 적당한 송달체계 및 다른 성장인자들과의 상호작용, 염증이나, 흡연, 전신 질환과 같은 조건에서의 효과 등을 알아보는 방향으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

치주조직의 재생에서 연구의 대상이 되고 있는 치주인대세포에 BMP를 투여하였을 때 세포의 활성이 어느 정도로 영향을 받는지를 알아보고, ALP 활성을 통해 BMP가 치주인대세포에 작용하여 어느 정도 골형성 능력을 가지는지를 평가할 목적으로 시행한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT 분석에 의한 치주인대세포의 활성은 배양 2일째 300 ng/ml의 농도에서 최고 148. 15 ± 4.78 의 유의한 세포의 활성 증가를 나타냈으며, 배양 기간에 상관없이 전 군 모두 대조군에 비해 유의한 세포활성의 증가를 나타냈다($P < 0.05$).
2. ALP 분석에 의하면, 배양 1일째 대조군에 비해 100, 300, 700, 1000 ng/ml의 농도에서 유의성있는 ALP활성 증가를 나타냈고, 배양 2일째와 3일째에는 500, 700, 1000 ng/ml의 고농도에서 대조군에 비해 유의한 ALP활성의 증가를 보였다($P < 0.05$).
3. 이상과 같은 연구결과를 바탕으로, BMP가 배양인체 치주인대세포에 세포독성이 없다는 것과 BMP가 치주인대세포에 작용하여 500 ng/ml의 고농도에서 골 형성 능력을 자극한다는 것을 알수 있었다.

참고문헌

1. Caton JG, Quinones CR. : Etiology of periodontal diseases. *Curr Opin Dent* 1 : 17-28, 1991.
2. Caton JG, Nyman S, Zander HA. : Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regeneration procedures. *J Clin Periodontol* 7 : 22-27, 1980.
3. Listgarten MA, Rosenberg MM. : Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodontol* 50 : 333-344, 1979.
4. Cho MI, Grant PR. : Sequential events in the formation of collagen secretion granules with special reference to the development of segment-long-spacing like aggregates. *Anat Rec* 199 : 309-320, 1981.
5. Cho MI, McCarthy PR. : Role of microtubules in the organization of the Golgi complex and secretion of collagen secretory granules by periodontal ligament fibroblasts. *Anat Rec* 199 : 459-471, 1981.
6. Sodek J, Berkman FA. : Bone cell cultures. In : *Methods in Enzymology*, Vol.145 Academic Press 303-324, 1987.
7. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodont Res* 25 : 179-185, 1990.
8. Topham RT, Chieco DJ Jr, Gattone VH, Hinton DA, Klein RM. : The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dev Biol* 124 : 532-543, 1987.
9. 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.

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. S ren 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 Samuel 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 polypeptide growth factors in vitro : *J Periodontol* 63 : 515–525, 1992.
15. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antonia-des HN : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regenerations. *J Clin Periodontol* 16 : 545–548 : 1989.
16. Dana T, Graves, David L. Cochran : Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. *Curr Opin in Periodontol* 178–186, 1994.
17. Wozney, J.M., V.Rosen, A.J. Celeste, L.M. Mitsock, M.J. Whitters, R.W. Kriz, R.M. Hewick, and E. A. Wang. : Novel regulators of bone formation : molecular clones and activity. *Science(Wash. DC)* 242 : 1528–1534, 1988.
18. Luyten, F.P., N.S.Cunningham, S.Ma, N. Muthukumar, R.G. Hammonds, W.B. Nevins, W.I. Wood, and A.H. Reddi. : Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein inhibiting bone differentiation. *J Biol Chem* 264 : 13377–13380.
19. Lyons, K., J. L. Graycar, A. Lee, S. Hashimi, P.B.Lindquist, E.Y. Chen, B.L.M. Hogan, and R. Derynck. : Vgr-1, a mammalian gene related to Xenopus Vg-1, is a member of transforming growth factor β gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 4554–4558, 1989.
20. Zkaynak, E., D. C. Reuger, E. A. Drier, C. Corbett, R. J. Ridge, T. K. Sampath, and H. Oppermann. : OP-1 cDNA encodes and osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO(Eur. Mol. Biol. Organ)* J 9 : 2085–2093, 1990.
21. Sampath, T.K., J. E. Coughlin, R.M. Whetstone, D. Banach, C. Corbett, R. J. Ridge, E. zkaynak, H. Oppermann, and D. C. Reuger. : Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem* 265 : 13198–13205, 1990.
22. Wozney, J.M. : Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1 : 267–280, 1989.
23. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 113 :

- 681–687, 1991.
24. Bentz, H., R. M. Nathan, D. M. Rosen, R. M. Armstrong, A. Y. Thompson, P.R. Segarini, M. C. Mathews, J. R. Dasch, K.A. Piez, and S.M. Seydin. : Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem* 264 : 20805–20810, 1989.
 25. Wang E.A., V. Rosen, P. Cordes, R.M. Herwick, M. J. Kriz, D.P. Luxenberg, B. S. Sibley, and J. M. Wozney. : Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 9484–9488, 1988.
 26. Wang E.A. V. Rosen, J. S. D'Alessandro, M. Baudy, P. Cordes, T. Harada, D. I. Israel, R. M. Herwick, K. M. Kerns, P. Lapan, D. P. Luxenberg, D. McQuaid, I. K. Moutsators, J. Nove, and J. M. Wozney. : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 2220–2224, 1990.
 27. Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA : Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor : functional, histologic, and biomechanical evaluation in calvarial defects in adult primates. *Plast Reconstr Surg* 90 : 382–393, 1992.
 28. Ripamonti U, MA S, Van Den Heever B, Reddi AH : Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrate, induces rapid bone differentiation in calvarial defects in adult primates. *Plast Reconstr Surg* 90 : 382–393, 1992.
 29. Bowers G, Felton F, Middleton C, Glynn D, Sharp S, Mellonig J, Corio R, Emerson J, Park S, Suzuki J, MAS, Romberg E, Redi AH : Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects. *J Periodontol* 62 : 690–702, 1991.
 30. Dowben RM : Biological membranes. Little, Brown and Co., Boston 1969.
 31. Reddi AH, Huggins CB : Biomechanical sequences in the transition of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 69 : 1601–1605, 1972.
 32. Jaffe NR : Alkaline phosphatase activity, characterization, and subcellular distribution during initial skeletogenesis in the prenatal rat limb. *Calcif Tissue Res* 21 : 153–162, 1976.
 33. Krzysztof H, Wlodarski and A. H. Reddi : Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue int* 39 : 382–385, 1986.
 34. Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J, and Planten, S. : Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol* 7 : 394–401, 1980.
 35. 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.
 36. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 11 : 494–503, 1984.
 37. Caffese, R.G., Dominguez, L.E., Nasjleti, C.E., Castelli, W.A., Morrison, E.C. and Smith, B.A. : Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration (GTR). *J Periodontol* 61 : 45–50, 1990.
 38. Chung K.H, Salkin, L.M, Stern, M.D. and Freedman, A.L. : Clinical evaluation of a biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Periodontol* 61 : 732–736, 1990.
 39. Gould, T.R.L., Melcher, A.H. and Brunette, D.M. : Migration and division of progenitor cell populations in periodontal liga-

- ment after wounding. *J Periodont Res* 15 : 20–42, 1980.
40. Gould, T.R.L. : Ultrastructural characteristics of progenitor cell populations in the periodontal ligament. *J Dent Res* 62 : 873–876, 1983.
 41. McCulloch, C.A.G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec* 211 : 258–262, 1985.
 42. Davidson, L. and McCulloch, C.A.G. : Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations. *J Periodont Res* 21 : 414–428, 1986.
 43. Aukhi, I. Simpson, D.M., Suggs, C and Pette-
rson, E. : In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament : An experimental study using physical barriers. *J Clin Periodontol* 13 : 862–868, 1986.
 44. McCulloch, C.A.G., Nementh, E., Lowenberg, B., and Melcher, A.H. : Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Ant Rec* 219 : 233–242, 1987.
 45. Rutherford RB, Sampath TK, Reuger DC, Taylor TD : Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endo-osseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Surg* 7 : 297–301, 1992.
 46. Reddi AH. : Regulation of bone differentiation by local and systemic factors. In bone and mineral research. W.A. Peck, editor. Elsevier North Holland, Amsterdam. vol.3, 27–47, 1985.
 47. Urist, M.R. : Bone : formation by autoinduction. *Science(Wash. DC)* 150 : 893–899, 1965.
 48. Urist, M.R., R. J. DeLange, and G. A. M. Finerman. : Bone cell differentiation and growth factors. *Science(Wash. DC)* 220 : 680–686, 1983.
 49. Yuji Hiraki, Hiroyuki Inoue, Cohei Shigen, Yuji Sanma, Hanne Bentz, David M. Rosen, Akira Asda, and Fujio Suzuki : Bone morphogenetic proteins(BMP-2 and BMP-3) promotes growth and expression of the differentiated phenotype of Rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone and Mineral Res* vol 6, 12 : 1373–1385, 1991.
 50. Robinson, R. : X X X III. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem J* 17 : 286–293, 1923.
 51. Siffert, R.S. : The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J Exp Med* 93 : 415–425, 1951.
 52. Farley JR, Ivey JL, Baylink DJ : Human skeletal alkaline phosphatase-kinetic studies including pH-dependence and inhibition by theophylline. *J Biol Chem* 255 : 4680–4686, 1980.
 53. Cyboron GW, Wuthier RE : Purification and initial characterization of intrinsic membrane-bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* 256 : 7262–7268, 1981.
 54. Vukicevic S, Luyten FP, Reddi AH : Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 8793–8797, 1989.

EFFECTS OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN(BMP) ON HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS IN VITRO

Seong-Jin Lee, Hyung-Jin Yoon, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

Periodontitis is characterized by gingival inflammation and results in periodontal pocket formation with loss of the supporting alveolar bone and connective tissue around the teeth. Therapeutic modalities should therefore aim not only at eliminating the gingival inflammatory process and preventing the progression of periodontal disease but also at re-establishing and regenerating the periodontal tissue previously lost to the disease. To achieve periodontal regeneration, progenitor cells must migrate to the denuded root surface, attach to it, proliferate and mature into an organized and functional fibrous attachment apparatus. Likewise, progenitor bone cells must also migrate, proliferate, and mature in conjunction with the regenerating periodontal ligament. Significant advances have been made during the last decade in understanding the factors controlling the migration, attachment and proliferation of cells. A group of naturally occurring molecules known as polypeptide growth factors in conjunction with certain matrix proteins are key regulators of these biological events. Of these, the fibroblast growth factor(FGF), platelet-derived growth factor(PDGF), insulin like growth factor(IGFs), transforming growth factor(TGFs), epidermal growth factor(EGF) and bone morphogenetic growth factor(BMPs) appear to have an important role in periodontal wound healing.

The purpose of this study was to determine the effects of BMP on periodontal ligament cells. Human periodontal ligament cells were cultured from extracted tooth for non-periodontal reason. Cultured periodontal ligament cells were treated with BMP. Cellular activities were determined by MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay and ALP(alkaline phosphatase) activity.

The results were as follows ;

Regardless of cultured time, cellular activities were stimulated by BMP. Also, BMP greatly increased alkaline phosphatase(ALP) in periodontal ligament cells. These results suggest that BMP not only have no cytotoxic effect on periodontal ligament cells, but also have osteogenic stimulatory effect on periodontal ligament cells.