

치주인대 세포의 교원질 생성에 대한 Substance P의 효과

진 준 영¹⁾ · 최 제 용²⁾ · 경희문³⁾ · 성 재 현⁴⁾

Substance P는 교정력이 가해진 치아의 치주인대 중 인장력을 받는 부위에 많이 분포하는 neuropeptide 중의 하나이며, 또한 여러 조직에서 neurogenic inflammation을 야기하는 neuropeptide 중의 하나로도 알려져 있다. 그러나 중요한 세포의 단백질인 교원질의 생성에 대한 Substance P의 효과는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 이 연구의 목적은 배양 치주인대 세포에서 교원질 생성에 대한 Substance P의 효과를 평가하는 것이었다. collagenase-digestion method로 교원질 생성을 평가하였고 mRNA 수준에서 작용효과를 평가하기 위하여 Northern blot hybridization을 시행하였다. 이 연구는 또한 교원질 생성에 대한 prostaglandin과 gelatinase 생성도 포함하였으며 변성된 교원질의 분해를 평가하기 위하여 zymography를 이용하였다.

비교원성 단백질, 교원성 단백질, 상대교원질에 대한 dose-dependent effect를 보면 Substance P는 비교원성 단백질 합성을 증가시켰으나 교원성 단백질 합성은 감소시켰다. 그리하여 총 단백질 합성에 대한 상대적인 교원질 생성을 나타내는 상대교원질은 7%에서 3.6%로 감소시켰다. 세포를 indomethacin과 동시에 처리할 때 substance P의 교원질 합성 억제효과는 나타나지 않았다. 이것은 Substance P의 교원질 합성 억제효과가 prostaglandin의 생성 때문이라는 것을 의미한다. Substance P의 교원질 합성 억제효과가 procollagen mRNA의 정상(steady-state)수준에 부합하는가를 평가하기 위하여 northern blot hybridization을 시행한 결과 Substance P는 $\alpha 1(1)$ procollagen mRNA의 양적 변동을 일으키지 않았다. Substance P의 교원질 생성 억제효과는 전사이후의 어떤 단계에서 이루어지는 현상임을 나타낸다. 치주인대세포에서 gelatinase 생성에 대한 Substance P의 효과를 알아보기 위하여 zymography를 이용하였다. zymogram을 보면 Substance P는 치주인대세포에서 gelatinase 생성에는 아무 효과도 나타내지 않음을 알 수 있다. Substance P의 교원질 생성 억제효과가 치주인대세포에 대해 선택적인가 아닌가를 알아보기 위하여 MC3T3-E1세포를 이용하였는데 Substance P는 MC3T3-E1세포의 교원질 합성에는 영향을 미치지 않았다.

이상에서 Substance P는 인간의 치주인대세포에서 교원질 합성을 억제하였다. 이 효과는 procollagen mRNA와 gelatinase 생성의 정상(steady-state) 수준의 변화 때문이 아니라 prostaglandin 생성과 연관이 있음을 알았다.

(주요단어 : Substance P, 교원질 생성, 치주인대세포)

I. 서 론

교정력에 의한 치아 이동은 염증 반응을 매개로 한 치아 주위 조직의 적응과정이다. 즉 외부로부터 치아에 전달되는 기계적인 힘은 치아 주위 조직의 염증

반응을 통하여 골 개조 과정을 포함한 조직의 재형성을 유도한다. 이러한 치아 이동의 기전에 대한 연구로서 초기 연구에서는 주로 교정력을 가한 치아 주위 조직의 형태학적 변화³⁹⁾를 관찰하였고 그 후 세포생물학의 발달과 더불어 치아 이동시 이차 전령 물질들의 연구가 활발히 진행되었다. 즉 교정력을 가한 치아 주위 조직에 cAMP 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)^{32,43)} 등의 증가가 있었고 Davidovitchi 등⁸⁾과 Ngan 등³⁴⁾도 cAMP를 경유한 골 개조 현상을 주장하였다. 그러나

¹⁾경북대학교 치과대학 교정학교실, 대학원생

²⁾경북대학교 치과대학 구강생화학교실, 조교

³⁾경북대학교 치과대학 교정학교실, 부교수

⁴⁾경북대학교 치과대학 교정학교실, 교수

이러한 단순한 설명만으로는 치아 이동의 기전을 설명하는데 부족하여 다른 각도에서 접근이 시도 되었다. 이러한 관점에서 연구되고 있는 것은 주로 염증 반응의 매개인자로 여러 가지 cytokines 및 growth factor의 골 세포 및 치주인대 세포에 대한 것들이다. 최근에 이러한 견지에서 연구된 예로 김 등¹⁸⁾은 interferon- γ 가 치주인대 세포의 교원질 합성과 alkaline phosphatase의 활성을 억제한다고 하였다. 그 밖에 골대사에 중요한 국소인자로는 interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin like growth factor-1 (IGF-I)등과 prostaglandins (PGs), leukotrienes (LT)등도 치아의 이동 속도를 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다⁴¹⁾

이러한 cytokine 외에 최근에는 neuropeptide들에 의한 신경성 염증반응의 유발에 대한 연구가 진행되었다^{21,28)}. Substance P는 여러 가지 신경 전달물질 중 하나이고 11개의 아미노산으로 구성된 neuropeptide로서 카복시말단의 아미노산이 Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂로 구성된 tachykinin 계열의 물질이다. 조직에서 발견되는 substance P는 대부분 신경세포에서 만들어진 것이지만 eosinophil도 일부 만들 수 있는 것으로 알려져 있다⁴⁸⁾. Substance P의 기능은 주로 감각신경계에서 통증을 지각하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 신경 전달 기능 외에 신경성 염증 반응을 일으킬 수 있는 물질로 특히 관절염 유발인자로도 잘 알려져 있다²⁴⁾. 관절의 활막세포에서 substance P는 collagenase의 활성 및 PGE₂²⁵⁾의 증가와 연골세포에서도 collagenase의 생성을 증가시킨다고 하였다. 또한 직접 조섬유세포에 작용하여 세포를 증식시킨다고 하였다³⁶⁾. Substance P는 단핵 탐식세포에 작용하여 IL-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-6 (IL-6) 등을 증가시켜 결체조직의 세포에 영향을 미치게 할 수도 있다고 알려져 있다^{20,26)}. 이와 같은 신경성 염증반응은 공통적으로 혈관 확장, plasma extravasation, 근육수축 등이 나타나고 감각 신경 말단에서 substance P, vasoactive intestinal peptide (VIP) 와 calcitonin gene related peptide (CGRP)등의 매개인자가 유리되어 나타나는 현상으로 알려져 있다. 이러한 반응은 눈, 피부, 호흡기 계통 및 내분비 계통에서도 잘 일어나는 현상이다^{1,30)}. 구강 조직과 관련되어 연구된 substance P의 작용은 주로 동통의 생리⁴²⁾ 및 치수와 치근단 염증질환에서의 염증 반응과의 연관성에 관한 연구들이 많이 되었다^{5,19)}. 또한 substance P가 구강 점막에서 신경성

염증 반응을 유발할 수 있는 것으로 보고 되었다¹³⁾. Substance P는 치주인대 뿐 아니라 골조직 및 골수에도 분포하여 골 형성을 증진시키는 것으로 알려져 있다²⁾.

치주인대 세포는 collagen으로 구성된 치주인대를 형성하는 주된 세포이고 또한 치아 이동시 염증반응에 직접 노출되어 있는 세포이다. 치아에 교정력이 가해지면 결체조직과 세포의 변형이 오고 이러한 조직의 변형이 치주인대의 감각신경 말단에 영향을 주어 substance P와 VIP같은 혈관확장성 neuropeptide를 분비하여 치주인대와 치수에 강한 substance P와 VIP의 분포를 나타나게 한다^{8,35)}. 이러한 neuropeptide는 적어도 endothelial cell, 조섬유세포, 및 치조골의 골아세포등에 작용한다고 알려져 있다.

본 실험에서는 substance P가 교정력을 가한 치아의 치주인대 중 인장력을 받는 부위에 많이 분포한다는 사실⁸⁾을 근거로 치주인대의 주된 성분이고 치주인대 세포의 생산물 중 많은 부분을 차지하는 교원질의 합성에 대하여 알아보하고자 하였다. Substance P의 기능 중 교원질 합성에 대한 것은 지금까지 보고되지 않았다. 따라서 substance P의 교원질 합성에 대한 효과와 아울러 부분적으로 어떠한 기전으로 교원질 합성에 영향 미치는지 알아보기 위하여 교원질 합성에 영향을 주는 인자 중 하나이고 substance P에 의하여 증가된다는 PGE₂의 관련성을 indomethacin 처리로 알아보았다. 또한 외력을 가하면 metalloproteinases³¹⁾가 증가된다는 사실을 근거로 substance P가 교원질 분해 효소 중 하나인 gelatinase의 생성에 관여되는지 알아보하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), alpha minimal essential medium(α -MEM)과 fetal bovine serum(FBS)은 GibcoBRL사(미국)에서 구입하였다. Substance P, Trypsin, bovine serum albumin(BSA), ascorbic acid, N-ethylmaleimide, 및 정제된 bacterial collagenase (type VII)는 Sigma사(미국), Hoecht 33258은 Fluka사(미국)에서, random primed labeling kit는 Boehringer Mannheim사(독일)에서 구입하였다. Sephadex G-50은 Pharmacia 사(스웨덴), L-[2,3-³H] proline(12.4 Ci/mmol)은 NEN

사(미국)의 제품을, 세포배양용 플라스틱 용기는 Costar사(미국)의 제품을 사용하였고, 기타 시약은 시판되는 일급 시약을 사용하였다.

2. 연구방법

1) 세포배양

교정치료를 위하여 발거한 13세 여자의 상악 좌측 제일 소구치에서 치주인대 조직을 Suh 등⁴⁵⁾의 방법으로 다음과 같이 채취하였다. 치근 및 치경부측 1/3을 큐렛으로 제거한 후 치아를 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin 및 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액에서 3회 세척하고 치근의 중간 1/3 부위의 치주인대를 채취하여 세절한 다음 100 mm 배양 접시에 고르게 분산시켰다. 여기서 얻은 세포를 치주인대 세포라하고 계대배양하여 저장 및 실험에 사용하였다. MC3T3-E1 세포는 Kodama 등²²⁾에 의해 마우스의 두개골에서 유래된 골아세포로서 Sudo 등⁴⁴⁾의 방법으로 10% FBS가 함유된 α -MEM 배양액에 배양하였고, 계대배양시 0.001% pronase/0.01% EDTA를 처리한 후 1:4로 계대배양하였다.

2) DNA 양 측정

DNA 양은 Labarca와 Paigen²³⁾ 방법을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 시료는 collagen 합성능 측정에 사용한 세포균질액 중에서 100 μ l를 취한 것이며, 표준용액은 송아지의 흉선 DNA로 하였다. 시료와 표준용액에 Hoechst 33258을 2 ml 인산완충액 (0.05M Na₃PO₄, pH 7.4)으로 희석하여 최종농도가 0.2 μ g/ml 되게한 다음 분광형광광도계 (Model MK-2, Farrand사, 미국)로 excitation 356 nm, emission 458 nm의 파장에서 측정하였다.

3) 비교원성 단백질, 교원질 및 상대교원질 합성의 측정

치주인대 세포 및 MC3T3-E1 세포를 한 well 당 1 x 10⁵개씩 24 well 배양 plate에 접종한 후, 3일 뒤 밀생상태가 되도록 하였다. 배양액을 50 μ g/ml의 ascorbic acid와 일정한 농도의 각 약제가 든 용액으로 갈아주고 2 μ Ci의 [³H] proline을 함께 넣어 주었다. 24 시간 동안 방사능이 편입되도록 한 후 세포배양액에 5x collagenase 완충액 (0.25 M Tris, 0.025 M CaCl₂, 0.0125 M N-ethylmaleimide, 100 μ M PMSF, pH 7.4) 250 μ l씩 넣어서 측정할 때까지 -20°C에 보관

하였다. 총단백질과 collagen합성능의 측정은 Peterkofsky 등³⁸⁾의 방법에 따라 다음과 같다.

24 well plate의 각 well의 세포층을 초음파 분쇄기로 (Fisher사, 미국) 30 초간 마쇄한 후, 1 ml씩을 취하여 5 ml의 polypropylene 관에 넣고 BSA (2 mg/ml) 200 μ l와 50% TCA/5 mM proline 용액 300 μ l를 첨가하여 잘 섞었다. 4°C에 30분 방치한 뒤 1000x g (Sorvall RT 6000, 미국)로 5 분간 원침하여 상청액을 제거하였다. 침전물에 5% TCA/1 mM proline을 1 ml 첨가하고 잘 교반한 후 같은 속도로 원침하였다(3회 반복). 침전물을 0.2 N NaOH에 녹이고, 1 M HEPES 완충액 (pH 7.2) 130 μ l를 첨가하여 중화시킨 후 5x collagenase 완충액 100 μ l를 넣었다. 이 혼합 용액을 2개의 미량원침관에 각각 250 μ l씩을 넣고 15 U의 collagenase를 하나의 미량원침관에 넣고 나머지는 완충액 15 μ l를 넣었다. 각각을 37°C 수조관에 90분 동안 반응시킨 뒤 0°C로 냉각시키고, 50% TCA/2.5% tannic acid 50 μ l를 첨가하여 4°C에서 30분간 방치하였다. Collagen 합성능은 collagenase로 처리된 관의 상청액과 5% TCA로 한 번 씻은 상청액을 합한 것으로 계산되었다. 총단백질량은 collagenase 처리하지 않은 관의 침전물을 100 μ l의 0.2 N NaOH에 녹인 것으로 하였다. Collagen 합성의 상대적 비율을 총단백질 합성에 대한 백분율로 다음과 같은 공식으로 계산하였다³⁸⁾.

Percent collagen(%) =

$$\frac{\text{collagen disintegration per minute(dpm)} \times 100}{(\text{total protein dpm} - \text{collagen dpm}) \times 5.4 + \text{collagen dpm}}$$

비교원성 단백질의 합성능은 총단백질의 dpm에서 교원질의 dpm 값을 뺀 값이다. 단위는 DPM/DNA (pg)로 하였다.

4) 총 RNA의 추출

세포를 1 x 10⁶ cells/100 mm plate가 되도록 접종한 후 3일 간 밀생상태가 되도록 하였다. 교원질 측정 때와 같은 조건으로 24시간 처리한 후 RNA를 Chomczynski와 Sacchi⁶⁾의 방법에 따라 분리하였다. RNA를 U.V 분광광도계 (Gilford사, 미국)로 260/280 nm에서 흡광도를 잰 후 양과 순도를 계산하였다.

5) cDNA 준비

본 실험에 사용된 cDNA는 Hf677⁷⁾과 glycerol-

dehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)⁴⁶⁾ cDNA였다. Sambrook 등⁴⁰⁾의 방법에 따라 cDNA를 준비하였다.

6) Northern blot hybridization

- ① 기구와 실험용액 제조 : RNA 실험과 관련된 모든 기구는 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)용액을 처리하여 사용하였다. RNA 실험에 관련된 모든 용액은 0.01% DEPC를 처리한 재증류수로 만들어 멸균하여 사용하였다.
- ② RNA 전기영동 : 총RNA는 10 μ g, 2 μ l의 10 x running 완충액 [0.2 M sodium morpholinopropane sulfonate (MOPS, pH 7.0), 80 mM sodium acetate, 10 mM EDTA (pH 8.0)], 3.5 μ l의 formaldehyde, 10 μ l의 formamide, 그리고 재증류수로 총 20 μ l가 되도록 하여 섞은 뒤 65°C에서 15분간 방치하였다. 열음에서 식히고 2 μ l의 gel loading 완충액 [50% glycerol, 1 mM EDTA(pH 8.0), 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF]을 넣어 formaldehyde agarose gel 전기영동을 Sambrook 등⁴⁰⁾의 방법에 따라 시행하였다.
- ③ RNA transfer : 전기영동이 끝난 gel을 재증류수에 몇 번 세척하여 formaldehyde를 제거하고, UV transilluminator에서 관찰하고 사진을 찍은 다음 nitrocellulose (NC) membrane으로 RNA를 옮기는 것은 Sambrook 등⁴⁰⁾의 방법으로 다음과 같이 하였다. 먼저 0.05 N NaOH에 20분간 RNA를 부분적으로 수화 절단하고 다음으로 45분간 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na₃Citrate-2H₂O, pH 7.0) 용액 중에 두었다. RNA를 NC membrane에 옮긴 후 80°C 건조기에서 2시간 동안 진공 건조시킨 후 hybridization을 시행할 때까지 dessicator에 보관하였다. Gel 중의 RNA가 완전히 NC membrane으로 옮겨갔는지 확인하기 위하여 위의 gel을 염색 용액(0.5 μ g/ml of ethidium bromide in 0.1 N ammonium acetate)에 넣어 45분간 흔들여 준 후 UV transilluminator로 gel 중의 RNA가 남아 있는지의 여부를 판정하였다.
- ④ cDNA labeling 및 분리 : cDNA는 Feinberg 및 Vogelstein¹²⁾의 방법을 이용한 random primed DNA labeling kit를 사용하여 [α -³²P] dCTP로 labeling 하였다. Label된 cDNA와 유리 [α -³²P] dCTP를 Sephadex G-50으로 채워져 있는 spin-column을 이용하여 gel filtration chromatography

를 시행하여 분리하였다⁴⁰⁾

- ⑤ Hybridization 과 자가방사법: Nitrocellulose (NC) membrane을 prehybridization 하기 전에 한 번 더 80°C에서 2시간 동안 진공상태에서 건조시켰다. NC membrane을 42°C의 prehybridization 용액 [50% formamide, 2x SSC, 0.05 M sodium phosphate 완충액 (pH 6.5), Denhardt'용액 (0.02% polyvinyl pyrrolidone (MW, 4000), 0.02% BSA, 0.02% Ficoll 400), 1% SDS, 100 μ g/ml heat denatured salmon sperm DNA]을 NC cm² 당 0.2 ml를 비닐 bag에 넣고 봉합한 후 1시간 동안 42°C로 유지된 수조에 담구었다. Prehybridization, hybridization 및 자가방사법은 Sambrook 등⁴⁰⁾의 방법으로 시행하였다.

7) Zymography

gelatinase의 양은 Heussen과 Dowdle¹⁷⁾의 방법을 기초로 다음과 같이 측정하였다. 24 well plate에 교원질 측정할 때와 같은 조건으로 세포를 처리한 후 상청액을 zymography 할 때까지 -20°C에 보관하였다. Gel 형성은 10% acrylamide, 0.1% gelatin이 되도록 하고 그 위에 0.05% Gelatin을 다시 굳힌 후 4% stacking gel을 형성하였다. 배지의 총 단백질 양을 Lowry²⁷⁾ 방법으로 측정한 후 같은 양(2 μ g)의 단백질이 되도록 하여 전기영동하였다. Gel을 2.5% Triton X-100에 30분간 담구든 후 metalloproteinase 완충액 (0.05M Tris-HCl, pH 7.6, 0.2M NaCl, 5mM CaCl₂, 0.2% Brij-35)으로 5분간 세정하였다. Gel을 다시 새로운 metalloproteinase 완충액에 넣어 37°C에서 15시간 둔 후 gel을 염색용액 (0.2% Coomassie Blue G250 in 30% methanol-10% acetic acid)으로 3시간 염색하고 탈염색 용액 (10% methanol, 7% acetic acid)으로 탈염색하여 30% methanol/0.01% glycerol에 넣은 후 공기 중에 셀로판 종이 사이에 넣어 말렸다.

III. 연구성적

1. 비교원성 단백질, 교원질 및 상대교원질 함성에 대한 substance P 농도에 따른 효과

비교원성 단백질, 교원질 및 총 단백질에 대한 교원질의 상대 적 함성비 즉 상대교원질 함성을 알아보기 위하여 치주인대 세포를 밀생상태가 되도록 한 후 substance P (10⁻⁸-10⁻⁶M)를 24시간 처리하였다. 비

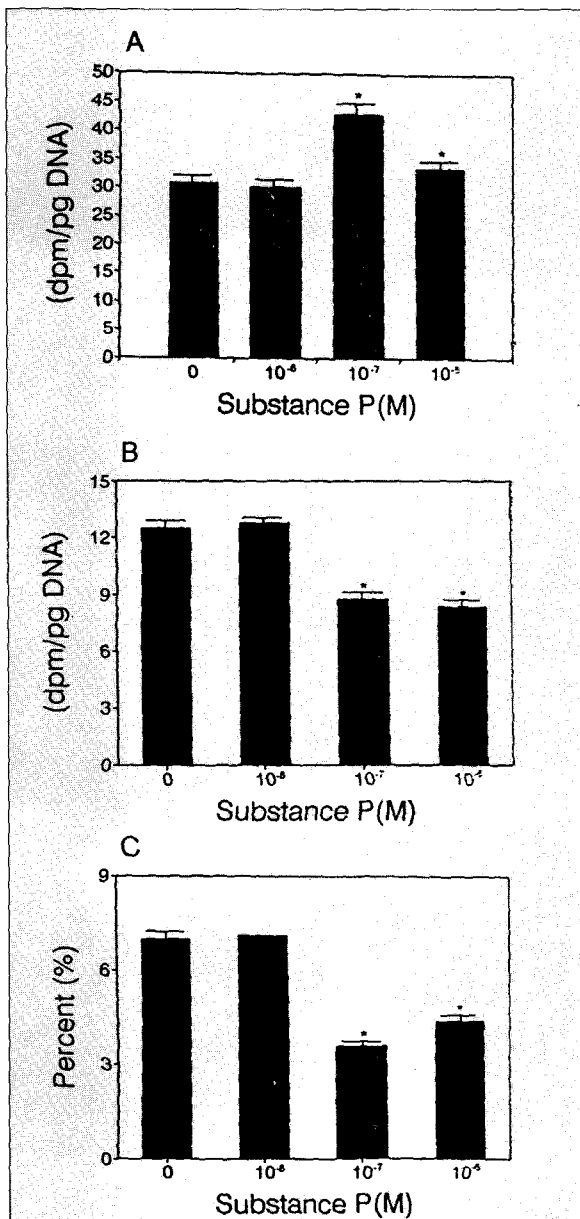


Fig. 1. Dose-response effects of substance P on noncollagen protein, collagen and percent collagen production in human periodontal ligament cells. Confluent cell cultures were treated with substance P (10^{-8} - 10^{-6} M) in medium and incubated simultaneously with 2 μ Ci/ml of [3 H] proline for 24 h. The medium and cell layer were harvested, and analysed as described in Materials and Methods. A) noncollagen protein, B) collagen, C) percent collagen. Data were expressed as mean (n=6). *P<0.01 vs. control. #P<0.05 vs. control.

Table 1. The time-response effects of substance P on collagen production in human periodontal ligament cells

Time (hours)	SP	NCP (dpm $\times 10^{-3}$)	Collagen (dpm $\times 10^{-3}$)	Percent collagen (%)
3	-	8.7 \pm 1.3	2.3 \pm 0.4	4.7 \pm 0.7
	+	7.9 \pm 1.1	1.6 \pm 0.3*	3.6 \pm 0.7#
6	-	9.1 \pm 1.0	4.0 \pm 0.4	7.5 \pm 0.3
	+	7.9 \pm 1.5	3.0 \pm 0.4*	6.7 \pm 0.7#
12	-	119.8 \pm 5.1	42.0 \pm 5.5	6.1 \pm 0.7
	+	98.0 \pm 5.3	27.4 \pm 3.0*	4.9 \pm 0.4*
24	-	196.4 \pm 9.6	115.4 \pm 6.1	9.8 \pm 0.6
	+	268.6 \pm 23.0*	105.7 \pm 7.8	7.0 \pm 0.7*

Cell cultures were treated with substance P (10^{-7} M) for indicated time and simultaneously labelled with [3 H] proline. Collagen production was determined by collagenase-digestion method as described in Materials and Methods. Data were expressed as mean \pm SD (n=6). Percent collagen is the percentage of newly synthesized collagen relative to total protein. NCP, noncollagen protein. SP, substance P. #P<0.05, significantly different from control. *P<0.01, significantly different from control.

교원성 단백질의 합성비는 10^{-7} M (43 dpm/pg DNA)에서 비교군 (30.8 dpm/pg DNA)보다 통계적으로 유의하게 높았고, 10^{-6} M 일때는 비교군과 유사하였다. 교원질 합성은 substance P의 농도가 10^{-7} , 10^{-6} M로 증가함에 따라 통계적으로 유의하게 감소되었다 (Fig. 1 B). 상대적 교원질의 합성은 비교군 (7.0%)에 대하여 10^{-7} , 10^{-6} M에서 각각 3.6%, 4.4%로 통계적으로 유의하게 감소되었다 (Fig. 1 C). 이러한 실험조건에서는 substance P에 의하여 세포의 형태나 DNA 양에는 변화가 없었다. 또한 이 후의 실험에서는 상대 교원질 합성을 가장 강하게 억제하는 substance P의 농도(10^{-7} M)로 하였다.

2. 비교원성 단백질, 교원질 및 상대교원질 합성에 대한 substance P의 시간에 따른 효과

Substance P에 의한 비교원성 단백질, 교원질 및 상대교원질 합성에 대한 시간적인 영향을 알아보기 위하여 3, 6, 12, 24시간 substance P와 [3 H] proline을 동시에 처리하여 분석하였다 (Table. 1). 비교원성 단백질의 합성은 substance P를 처리한 후 24 시간에서

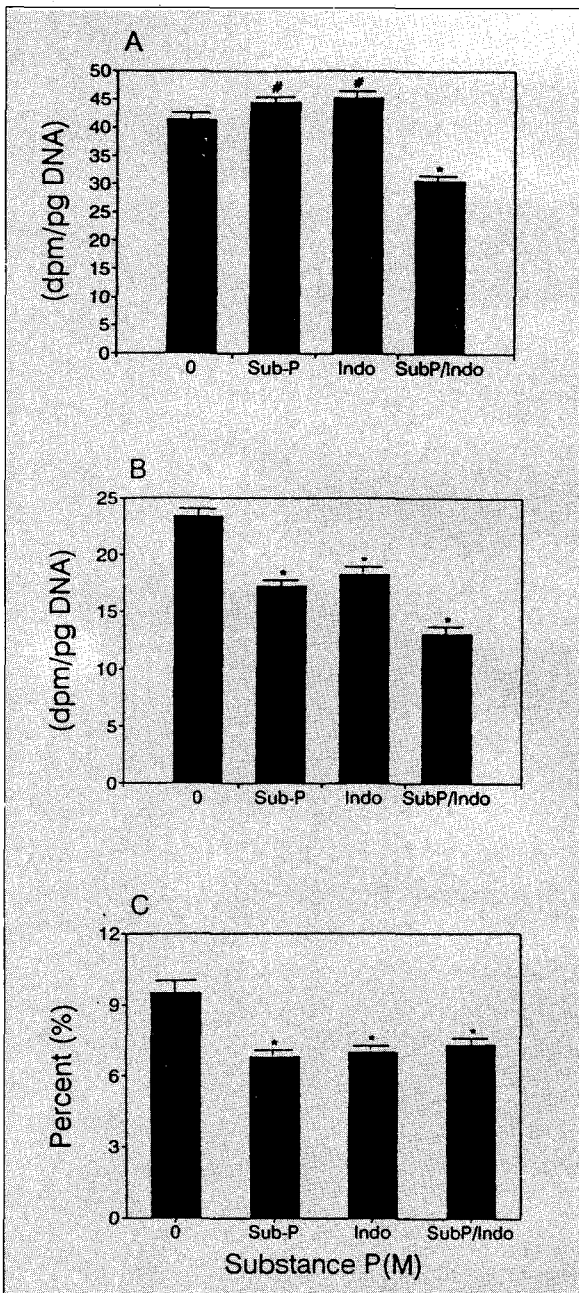


Fig. 2. Effect of indomethacin on substance P induced inhibition of collagen production by periodontal ligament cells. Confluent cultures were treated with substance P (Sub-P, 10⁻⁷M), indomethacin (Indo, 5 ug/ml) and substance P with indomethacin (SubP/Indo) for 24 h. A) noncollagen protein, B) collagen, C) percent collagen. Data were expressed as mean ± SD for six determinations. *P<0.01 vs. control.

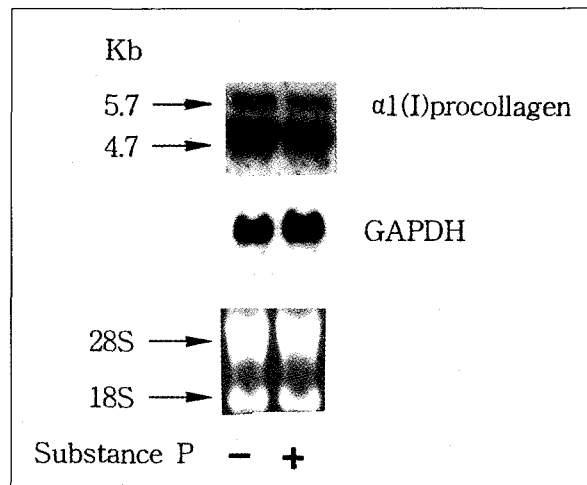


Fig. 3. Northern blot analysis of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA in human periodontal ligament cells. Total RNA (10 ug) samples extracted from cell cultured for 24 hrs in the presence (+) or absence (-) of substance P (10⁻⁷M) were separated on 1% agarose gels containing 2.2 M formaldehyde and transferred to a nitrocellulose membrane. Transfers were hybridized with ³²P-labelled cDNAs for $\alpha 1(I)$ procollagen and GAPDH and the resulting radioabelled bands detected by autoradiography. 28S indicate the position of the 28S, 18S ribosomal RNAs.

통계적으로 유의하게 증가되었고 교원질 및 상대교원질 합성은 3 시간부터 24 시간까지 substance P에 의하여 감소되었다.

3. Substance P에 의한 교원질 합성에 대한 indomethacin의 영향

Substance P에 의한 비교원성 단백질, 교원질 및 상대교원질 합성에 대한 효과가 prostaglandin을 매개로 하여 일어나는 현상인지 알아보기 위하여 indomethacin을 처리하여 알아보았다 (Fig. 2). Substance P (10⁻⁷M)는 비교원성 단백질의 합성을 Fig. 1에서와 같이 증가시켰고 (Fig. 2 A), 교원질 및 상대교원질의 합성은 감소되었다 (Fig. 2 B,C). Indomethacin은 비교원성 단백질의 합성을 통계적으로 유의하게 증가시켰고 교원질의 합성을 감소시켰다. 즉 상대교원질 합성은 비교군 보다 30%로 감소되었다. Substance P와

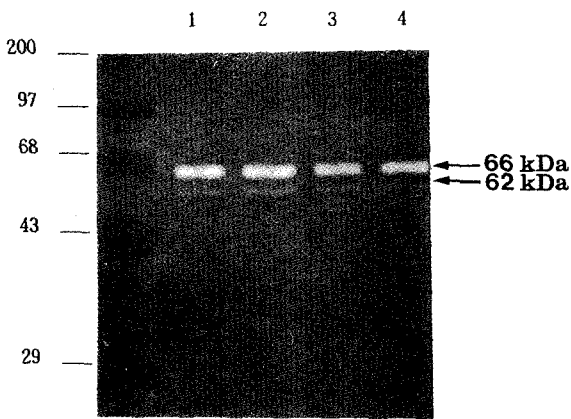


Fig. 4. Effects of substance P on gelatinase production in human periodontal ligament cells. Confluent cell cultures were treated with substance P (10^{-8} - 10^{-6} M) for 24 h. Medium was harvested and analysed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and fluorography as described in Materials and Methods. Control (lane 1), 10^{-8} M (lane 2), 10^{-7} M (lane 3), 10^{-6} M (lane 4) of substance P.

indomethacin을 함께 처리했을 때 비교원성 단백질의 합성은 비교군 보다 오히려 30% 감소하였다. 또한 교원질 합성도 비교군에 비하여 감소되었다. 그러나 상대교원질의 합성은 비교군에 비하여 감소되었으나 Indomethacin을 단독으로 처리한 군과 차이가 없어 substance P에 의한 상대교원질 합성의 감소는 cyclooxygenase에 의존적인 prostaglandin을 매개로 하여 일어나는 현상임을 나타내었다. DNA양은 indomethacin 단독 처리시 비교군 (5.9 ug/well)에 비하여 5.0 ug/well로 다소 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. Substance P 와 indomethacin을 함께 처리한 경우에는 5.7 ug/well로 비교군과 차이가 없었다.

4. Substance P에 대한 $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA 발현에 대한 효과

교원질 및 상대교원질 합성에 대한 substance P의 효과가 교원질 유전자의 선택적인 발현 억제로 인한 효과인지를 알아보기 위하여 $\alpha 1(I)$ procollagen cDNA (Hf677)로 Northern blot hybridization 하였다 (Fig. 4). Substance P에 의한 $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA의 발현은 교원질의 상대적인 단백질 수준과 다르게 차이가 없었다.

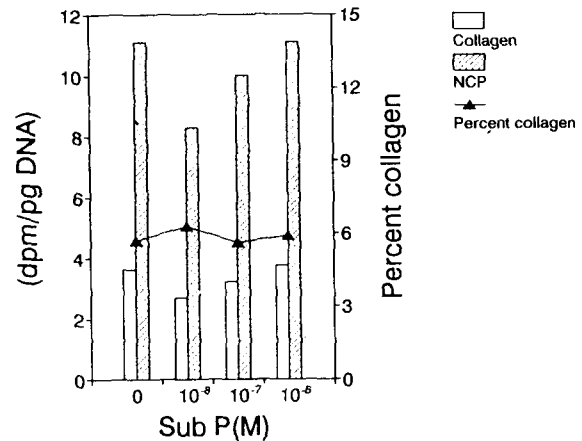


Fig. 5. Dose-response effects of substance P on noncollagen protein, collagen and percent collagen production in MC3T3-E1 cells. Confluent cell cultures were treated with substance P (10^{-8} - 10^{-6} M) in medium and incubated simultaneously with 2 uCi/ml of [3 H] proline for 24 h. The medium and cell layer were harvested, and analysed as described in Materials and Methods. NCP, noncollagen protein. Sub P, substance P. Data were expressed as mean (n=6).

5. Substance P에 의한 gelatinase 생성에 대한 효과

Substance P에 의한 교원질의 mRNA 양과 상대교원질 합성비에 대한 상반된 효과는 교원질 유전자 발현 조절에 있어서 전사 후 단계에서의 작용을 의미한다. 그 중 변성된 교원질을 파괴하는 gelatinase에 대한 substance P의 효과를 알아보기 위하여 zymography를 시행하였다. 세포의 배양 조건은 교원질 생성 때와 같은 조건으로 배양하여 배지에 유리되는 gelatinase의 양을 SDS-PAGE 하여 측정된 결과 치주인대 세포는 66, 62 kd 크기의 gelatinase가 관찰되었다. Substance P의 농도에 따른 gelatinase의 양적 변동은 관찰되지 않았다 (Fig. 5).

6. MC3T3-E1세포에 있어서 substance P의 농도에 따른 비교원성 단백질, 교원질 및 상대교원질 합성에 대한 효과

Substance P의 교원질 생성 억제 효과는 치주인대 세포외에 다른 세포에서도 일어나는 현상인지를 알

아보기 위하여 골조상아세포인 MC3T3-E1 세포를 사용하였다. 비교원질 및 교원질의 합성에는 농도에 따라 차이가 있었지만 상대교원질의 합성에는 차이가 없어 치주인대 세포와는 달리 교원질의 선택적인 생성 억제 효과는 없는 것으로 나타났다.

IV. 고 찰

본 연구는 치주인대 세포의 교원질 생성에 미치는 substance P의 영향을 알아 본 것이다. Substance P는 교원질 생성을 선택적으로 감소시켰다. 본 실험에서 교원질 생성의 평가는 [³H] proline을 단백질에 편입시킨 후 collagenase를 처리하여 측정하는 방법으로 하였다. 이러한 방법으로 얻은 상대적 교원질 합성의 값은 아미노산의 선택적 이동이나 세포의 단백질 합성능의 차이를 모두 고려한 값으로 상대적 교원질 합성의 감소는 곧 선택적인 감소를 의미한다. Substance P는 상대적 교원질 합성의 감소 뿐 아니라 교원질 합성 자체도 감소시켰다. 비교원성 단백질의 합성은 substance P에 의하여 오히려 증가되어 총 단백질에 대한 상대적 교원질의 합성은 더욱 감소되었다. 본 실험에서 사용한 substance P는 11개 아미노산으로 구성된 것이다. 연골세포¹⁵⁾에서 substance P는 11개의 아미노산 중 카복시말단 (7-11) 단편만 PGE₂ 및 collagenase 활성도를 증가시키고 11개 전체는 효과가 없다고 한 것을 고려한다면 이와 같은 substance P의 단편들의 교원질 생성에 대한 효과를 알아볼 필요가 있다고 생각된다. 또한 본 실험에 사용된 substance P의 농도에서는 세포의 형태 변화나 DNA 양의 변화 등이 관찰되지 않았다. Substance P의 사용 농도에 따라 크게 두가지 기전으로 세포 반응이 일어나는 것으로 알려져 있다. 하나는 10⁻⁷-10⁻⁴M로 micromole단위의 높은 농도일 때 아미노말단 (Arg-Pro-Lys-Pro)에 의한 효과⁹⁾로 알려져 있고 다른 하나는 이 보다 낮은 농도에서 이루어진 세포 반응으로 substance P의 수용체에 의하여 이루어지는 효과로 알려져 있다. 따라서 본 실험에 사용한 농도는 10⁻⁸-10⁻⁹M로서 수용체를 매개로한 효과인 것으로 생각된다.

Substance P의 교원질 생성에 대한 선택적인 억제 효과는 PGE₂를 매개로 하여 일어나는 것인지 알아보기 위하여 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin을 동시에 처리하여 조사하였다. Indomethacin과 substance P를 동시에 처리하였을 때 indomethacin 단독

으로 처리한 경우보다 상대적 교원질의 합성비에 차이가 없어 substance P의 선택적인 교원질 합성 억제 효과가 나타나지 않은 것으로 생각된다. 즉 substance P의 교원질 생성에 대한 선택적인 합성 억제 작용은 부분적으로 PGs의 생성과 관련이 있음을 나타낸다. 교원질 합성은 두 약제를 동시에 처리하였을 때 단독으로 처리한 경우보다 상승적으로 억제되었다. 이는 substance P에 의해 증가된 PGs이 교원질 생성을 증가시킬 수 있다는 의미가 된다. 이러한 결과는 피부 및 폐 조섬유세포에서와는 상반된 결과이다^{10,29,47)}. 그러나 골아세포인 MC3T3-E1세포에서 PGE₂에 의하여 교원질의 생성이 증가된다는 보고¹⁴⁾가 있어 세포마다 PG의 작용 양상이 다르리라 생각된다. 비교원성 단백질의 합성은 두 약제에 의하여 각각 증가되는 양상을 보였으나 동시에 투여시 오히려 감소하여 이러한 결과의 기전에 대해서는 현재의 실험으로 설명하기 곤란한 실정이다. 본 실험에서의 indomethacin에 대한 결과는 매우 흥미로운 사실로 좀더 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 본 실험에서 indomethacin이나 substance P가 단독으로 상대적 교원질 합성을 최대한 억제하였다면 두 약제를 동시에 처리하였을 때에는 그 효과를 보지 못할 가능성도 배제할 수 없어 두 약제 각각을 좀 더 낮은 농도 즉 suboptimal 농도로 실험해 보는 것이 아울러 필요하다고 생각된다.

Substance P에 의한 상대적 교원질의 선택적 합성 억제 효과는 3시간에서 적어도 24시간까지 나타났다. 이것은 Kim 등¹⁸⁾에 의한 interferon- γ 의 경우와 유사한 양상을 나타내었다.

Substance P의 교원질 합성에 대한 단백질 수준에서의 억제효과가 mRNA 수준에서도 같은 양상으로 나타나는지 알아본 결과 Substance P에 의한 교원질 mRNA 수준의 변화는 없었다. 본 실험에서 전사속도나 mRNA 안정도를 측정하지 않아 정확하게 전사단계에서의 효과를 언급할 수 없지만 정상(steady-state) 수준에서 mRNA의 양적 변동이 없었으므로 단백질 수준과 다른 결과임은 분명하였다. 따라서 substance P의 교원질 생성 억제 효과는 전사 이후의 어떤 단계에서 이루어지는 현상임을 나타낸다. 이 같은 맥락에서 변성된 교원질을 분해하는 gelatinase의 생성에 대한 substance P의 효과를 알아보았다. Gelatinase는 두개의 band로 주로 66 kDa band가 강하게 나타났고 62 kDa band는 약하게 나타났다. 62 kDa band는 활성화된 형태로서 본 실험에서는 전기

영동 과정에서 Herron 등¹⁶⁾에서와 같이 SDS에 의해 생긴 것으로 생각된다. 본 실험에서 나타난 치주인대의 두개의 gelatinase band는 72 kDa의 gelatinase로 치은 조섬유세포의 것과 같았다³⁷⁾. 72 kDa의 gelatinase 생성은 substance P에 의하여 큰 변화가 없었다. 즉 substance P의 교원질 합성 억제 기전은 gelatinase 외 다른 효소나 방법으로 교원질이 분해될 가능성이 있음을 나타내는 것이다. 교원질의 파괴는 gelatinase 뿐 아니라 collagenases, stromelysin, plasminogen 등에 의해서도 파괴됨으로 이러한 단백질에 대한 연구가 더 필요하다. 또한 collagenase의 활성화에 영향을 주는 요소도 배제할 수 없다. 아울러 세포내 여러 가지 collagenase inhibitor들의 발현도 함께 보는 것이 필요하리라 사료된다. 교원질 분해에 대한 또다른 예로 치주인대 세포에 의해 교원질이 탐식작용¹⁷⁾이 증가하여 세포내에서 분해될 수도 있고 그 외의 가능성으로 plasminogen 의존적인 기전이나 다른 metalloproteinase 기전 및 serine protease등에 의해서도 세포외 기질 단백질들의 분해가 가능하다³⁾. Substance P에 의하여 collagenase 활성화²⁵⁾의 증가나 plasminogen activator³³⁾의 증가를 고려해 볼 때 치주인대 세포에서도 이러한 요소들의 관련성을 시사하고 있다.

교원질 생성에 대한 substance P의 억제효과가 치주인대 세포외에 다른 세포에서도 일어나는지 알아보기 위하여 MC3T3-E1세포로 실험한 결과 치주인대 세포와는 다르게 상대적 교원질의 합성에 변화가 없었다. 이는 본 실험에서 사용한 두 세포 중 치주인대 세포에서만 선택적으로 일어나는 현상임을 나타낸다. 즉 치아에 교정력이 가해졌을 때 인장력을 받는 부위에 많이 나타나는 substance P는 치주인대 세포의 교원질 합성은 억제시키고 치조골에 존재하는 골아세포의 교원질 합성에는 영향이 없을 가능성이 있다. 즉 같은 인자에 노출시 세포의 종류에 따라 반응성이 달라 치아이동에 따른 치아주위조직의 적응기전에 많은 영향을 미칠 것으로 생각된다. 그러나 현재의 결과로는 어떠한 의미를 지니는지 알기 힘든 상태이며 향후 치조골의 골아세포를 이용한 in vitro 및 in vivo 실험이 병행되어야 설명이 가능하리라 생각된다.

본 실험에서는 치아 이동에 있어서 주된 역할을 하는 치주인대 세포를 배양하여 치주인대 세포의 주된 기능인 교원질 생성에 대한 substance P의 효과를 본 것이다. 신경 전달 물질의 하나인 substance P는 치주인대 세포에서 어떤 영향을 미치는지 알려진 바가

없다. 특히 교원질 합성에 대해서는 더욱 없는 실정이다. 본 실험에서는 substance P가 교원질 생성을 선택적으로 억제하였고 이러한 효과는 부분적으로 PG의 생성과 연관이 있고 RNA 수준에서 일어난 결과가 아니고 전사이후의 결과였다. 교원질 분해기전에 대하여 적어도 gelatinase와 어떤 효소의 발현 증가나 다른 기전으로 일어났으리라 생각된다. 아울러 substance P는 세포에 따라 또는 세포외 기질⁴⁾에 따라 다른 반응을 보임으로써 교정치료에 있어서 의미와 응용가능성을 더욱 추구해 보아야 할 것이다.

V. 결 론

치주인대세포에서 neuropeptide 중 하나인 substance P의 교원질 생성에 대한 효과를 알아보고자, 발치한 제1소구치의 치주인대세포를 배양하여 [³H] proline을 단백질에 편입시켜 collagenase-digestion 방법으로 교원질합성을 평가하고 또한 mRNA 수준에서 작용 효과를 보기 위하여 Northern blot hybridization을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 비교원성 단백질, 교원성단백질 및 상대교원질 합성비에 가장 큰 효과를 나타내는 substance P의 농도는 10^{-7} M 이었다.
2. substance P는 치주인대 세포의 비교원질 단백질 합성을 증가시키나. 교원질의 합성은 감소시켜 상대 교원질의 합성을 7.0%에서 3.6%로 현저히 감소시켰다.
3. substance P의 교원질 억제효과에는 prostaglandins의 작용이 부분적으로 관여 되어 있었다.
4. substance P는 교원질의 mRNA 수준에는 영향을 미치지 않았다.
5. substance P는 골아세포인 MC3T3-E1 세포에서는 교원질합성에 영향을 미치지 않았다.
6. substance P의 농도에 따라 gelatinase의 양적변동은 관찰되지 않았다.

이상에서 substance P는 치주인대세포의 교원질 생성을 선택적으로 억제하였으며 이러한 억제효과는 prostaglandins와 연관이 있음을 알았다.

REFERENCES

1. Barnes, P. J., Barniuk, J. N. & Belvisi, M. G. : Neuropep-

- tides in the respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144 : 1167-1198, 1991.
2. Bernard, G. W. & Shih, C. : The enhancement of osteogenesis with neuropeptides in vitro and ex vivo. in *The biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation*. Ed. Davidovitch, Z. pp 475-483, 1992.
 3. Birkedal-Hansen, H. : Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J. Periodont. Res.* 28 : 500-510, 1993.
 4. Bowers, C. W. & Dahm, L.M. : Extracellular matrix regulates smooth muscle responses to substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 8130-8134, 1992.
 5. Byers, M. R., Taylor, P. E., Khayat, B. G. & Kimberly, C. L. : Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *J. Endodont.* 16 : 78-84, 1990.
 6. Chomczynski, P. & Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159, 1987.
 7. Chu, M.-L., Myers, J. C., Bernard, M. P., Ding, J.-F. & Ramirez, F. : Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro α 1(I) collagen chain. *Nucleic Acids Res.* 10 : 5925-5934, 1982.
 8. Davidovitch, Z., Nicolay, O., Ngan, P. W. & Shanfeld, J. : Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodelling in orthodontics. *Dent. Clin. North. Am.* 32 : 411-435, 1988.
 9. Devillier, P., Renoux, M., Giroud, J. P. & Regolli, D. : *Eur. J. Pharmacol.* 117 : 89-96, 1985.
 10. Diaz, A. Munoz, E., Johnston, R., Korn, J. H. & Jimenez, S. A. : Regulation of human lung fibroblast α 1(I) procollagen gene expression by tumor necrosis factor α , interleukin- 1β , and prostaglandin E_2 . *J. Biol. Chem.* 268 : 10364-10371, 1993.
 11. Everts, V. & Beertsen, W. : Collagen phagocytosis in periodontal remodeling. in *The biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation*. Ed. Davidovitch, Z. pp29-36, 1992.
 12. Feinberg A. P. & Vogelstein, B. : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132 : 6-13, 1983.
 13. Gyorfi, A., Fazekas, A., Irnes, F., Jakab, G., Suto, T. & Rosivall, L. : Role of substance P (SP) in development of symptoms of neurogenic inflammation in the oral mucosa of the rat. *J. Periodont. Res.* 28 : 191-196, 1994.
 14. Hakeda, Y., Nakatani, Y., Kurihara, N., Ikeda, E., Maeda, N. & Kumegawa, M. : Prostaglandin E_2 stimulates collagen and non-collagen protein synthesis and prolyl hydroxylase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126 : 340-345, 1985.
 15. Halliday, D. A., McNeil, J. D., Betts, W. H. & Scicchitano, R. : The substance P fragment SP-(7-11) increases prostaglandin E_2 , intracellular Ca^{2+} and collagenase production in bovine articular chondrocytes. *Biochem. J.* 292 : 57-62, 1993.
 16. Herron, G. S., Banda, M. J., Clark, E. J., Gavrilovic, J. & Werb, Z. : Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 261 : 2814-2818, 1986.
 17. Heussen, C. & Dowdle, E. B. : Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102 : 196-202, 1980.
 18. Kim, G.-S., Sung, J. -Y., Choi, J.-Y. & Ryoo, H.-M. : Effects of interferon- γ on collagen and fibronectin synthesis in primary cultured periodontal ligament cells. *Korean J. Orthodon.* 23 : 229-248, 1993.
 19. Kim, S. : Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *J. Endodont.* 16 : 48-53, 1990.
 20. Kimball, E. F., Persico, E. & Vaught, J. L. : Substance P, neurokinin A and neurokinin B induce generation of IL-1-like activity in P388D1 cells. *J. Immunol.* 141 : 3564-3569, 1988.
 21. Kimball, E. S. : Substance P, cytokines, and arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.* 594 : 293-308, 1990.
 22. Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. & Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.*, 23 : 899-901, 1981.
 23. Labarca, C. & Paigen, K. : A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102 : 344-352, 1980.
 24. Levine, J. D., Clark, R., Devor, M., Helms, C., Moskowitz, M. A. & Basbaum, A. L. : Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science.* 226 : 547-549, 1984.
 25. Lotz, M., Carson, D. A. & Vaughan, J. H. : Substance P activation of rheumatoid synoviocytes ; neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science*, 235 : 893-895, 1987.
 26. Lotz, M., Vaughan, J. H. & Carson, D. A. : Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 241 : 1218-1220, 1988.
 27. Lowry, O. B., Rosenbrough, M. J., Farr, A. L. & Rebar, R. W. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 255-260, 1951.
 28. Mantyh, P. W. : Substance P and the inflammatory and immune response. *Ann. NY Acad. Sci.* 632 : 263-271, 1991.
 29. Mauviel, A., Kahari, V. M., Heino, J., Daireaux, M., Hartmann, D. J., Loyau, G. & Pujol, J. P. : Gene expression of fibroblast matrix proteins is altered by indomethacin. *FEBS Lett.* 231 : 125-129, 1988.
 30. Mayer, E. A., Raybould, H. & Koelbel, C. : Neuropeptides, inflammation, and motility. *Digest. Dis. and Sci.*

- 33 ; 71S-77S, 1988.
31. Meikle, M.C., Sellers, A. & Reynolds, J.J. : Effect of tensile mechanical stress on the synthesis of metalloproteinases by rabbit coronal sutures in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 30 : 77-82, 1980.
 32. Mostafa, Y. A., Weaks-Dybvig, M & osdoby, P. : Orchestration of tooth movement. *Am. J. Orthodon.* 83 : 245-250, 1983.
 33. Murphy, P. G. & Hart, D. A. : Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in connective tissues and connective tissue cells : influence of the neuropeptide substance P on expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1182 : 205-214, 1993.
 34. Ngan, P., Satto, S., Satto, M., Lanese, R., Shanfeld, J. & Davidovitch, Z. : The interactive effects of mechanical stress and interleukin-1 β on prostaglandin E and cyclic AMP production in human periodontal ligament fibroblasts in vitro : comparison with cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1). *Arch. Oral Biol.* 35 : 717-725, 1990.
 35. Nicolay, O. F., Davidovitch, Z., Shanfeld, J. L. & Alley, K. : Substance P immunoreactivity in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Bone Min.* 11 : 19-29, 1990.
 36. Nisson, J., von Euler, A. M. & Dalsgaard, C. J. : Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature*, 315 : 61-63, 1985.
 37. Overall, C. M., Wrana, J. L. & Sodek, J. : Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 264 : 1860-1869, 1989.
 38. Peterkofsky, B., Chojkier, M. & Bateman, J. : Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture systems, In : *Immunochemistry of the extracellular matrix*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp19-47, 1982.
 39. Rygh, P. : Periodontal response to tooth-moving force. In *Orthodontics : State of the art essence of science*. Ed. by Graber, L. W. Mosby. pp100-115, 1986.
 40. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. : *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory, pp7.46-7.52, 1989.
 41. Sandy, J. R., Farndale, R. W. & Meikle, M. C. : Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 1103 : 212-222, 1993.
 42. Sessle, B. J. : Anatomy, physiology and pathophysiology of orofacial pain. In *Headache and facial pain*. Ed. Jacobson, A. L and Donlon, W. C. Raven Press, New York pp1-24, 1990.
 43. Somjen, D., Binderman, I., Berger, E. & Harell, A. : Bone remodelling induced by physical stress is prostaglandin E₂ mediated. *Biochim. Biophys. Acta.* 627 : 91-100, 1980.
 44. Sudo, H., Kodama, H.A., Yamamoto, S., & Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96, 191-198, 1983.
 45. Suh, J. Y., Choi, J. Y., Ryoo, H. M., Park, J. B. & Jo, J. S. : Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Korean J. Oral Biol.* 15 : 14-27, 1990.
 46. Tso, J. Y., Sun, X. H., Kao, T. H., Reece, K. S. & Wu, R. : Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs : genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acid. Res.* 13 : 2485-2502, 1985.
 47. Varga, J., Diaz-Perex, A., Rosenbloom, J. & Jimenez, S. A. : PGE₂ causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147 : 1282-1288, 1987.
 48. Weinstock, J. V., Blum, A., Walder, J. & Walder, R. : Eosinophils from granulomas in murine Schistosomiasis Mansonii produce Substance P. *J. Immunol.* 141 : 961-966, 1988.

-ABSTRACT-

EFFECTS OF SUBSTANCE P ON COLLAGEN PRODUCTION IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Jun-Yeung CHUN, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Je-Yong Choi, D.D.S., M.S.D., Ph.D.
Hee-Moon Kyung, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Jae-Hyun Sung, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Kyungpook National University

Substance P is one of the neuropeptide which presents highly in tension site of periodontal ligament during the orthodontic tooth movement. It has been also known as one of the neuropeptides which cause neurogenic inflammation in various tissues and organs. However, there is no report about the effect of substance P on major extracellular matrix protein, collagen production. The purpose of this study was to evaluate the collagen production by substance P in human periodontal ligament cell. The collagenase-digestion method was used to evaluate collagen production and also used Northern blot hybridization for the evaluation of collagen mRNA level. This study also included in terms of prostaglandins and gelatinase production with respect to collagen production. For the collagen degradation, zymography was used to estimate denatured collagen degradation.

Dose-dependent effect of substance P on noncollagen protein, collagen, and percent collagen was that substance P increased noncollagen protein synthesis, but decreased collagen synthesis. So the percent collagen, which determined by relative collagen production against total protein production, was decreased from 7% to 3.6%. This inhibitory effect of substance P on collagen production against total protein production, was decreased from 7% to 3.6%. This inhibitory effect of substance P on collagen production was disappeared when cells were treated concomitantly with indomethacin. It means that substance P-induced inhibitory effect on collagen production was due at least in part to the production of prostaglandins. To evaluate whether substance P-induced inhibitory effect on collagen production is correspond to the steady-state levels of procollagen mRNA, Northern blot hybridization was performed and it showed that substance P has no effect on the steady-state level of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA. It means that the inhibitory effect of substance P on collagen production was due to the change of a certain mechanism after posttranscription. In this context, gelatinase production by substance P in periodontal ligament cells was evaluated by zymography. Zymogram showed that substance P has no effect on gelatinase production in periodontal ligament cells. To explore whether substance P-induced inhibitory effect on collagen production is selective in periodontal ligament cells or not, MC3T3-E1 cells which originated from mouse calvaria was used. It showed that substance P has no effect on collagen production in MC3T3-E1 cells.

Taken together, substance P inhibits collagen production in human periodontal ligament cells. This effect was not due to the change of the steady-state level of procollagen mRNA and gelatinase production, but due at least in part to the change of prostaglandins production.

KOREA. J. ORTHOD. 1996 ; 26 : 83-94

※Key words : Substance P, Collagen production, Periodontal ligament cell