

혈소판유래성장인자와 상피성장인자가 치주인대세포와 골수세포의 성상에 미치는 영향

조병도 · 허익 · 박준봉 · 권영혁 · 이만섭

경희대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치은염증, 치주낭 형성 및 치아주위의 지지 치조골과 결합조직의 파괴를 야기하는 치주질환에 대한 치료개념은 새로운 이론의 도입과 분자생물학의 발전 등으로 많은 변천을 하였다. 과거에는 단순한 병적 조직과 원인제거 중심으로 이루어졌으나 많은 조직삭제로 인한 문제점이 나타나 근래에는 상실된 조직의 재생을 위한 시술이 시행되고 있다. 예컨대 modified Widman flap이 제시되어¹⁾ 외과적 치주낭제거보다는 재부착을 유도한 바 있으며, 치주골내낭의 처치에 골이식술을 시도한²⁾ 이래 이식술에 대한 연구도 많이 이루어져 왔다. 현재 사용되고 있는 이식재료로는 자가골, 동종골 및 합성골 등이 있으며 골결손부 재생에 효과를 보인다. 그러나 이러한 이식술은 술후 이차감염, 치근흡수와 강직, 이식재의 탈락 및 부골형성, 골 공급자의 전염성 질환이 이환될 가능성, 생체친화성 및 신생골 형성의 유도능력등의 문제점이 아직 남아 있다.

1976년 Melcher³⁾가 치주조직의 재생 잠재성에 관한 가설을 발표한 이후, 치주인대세포가 치주조직 재생에 가장 중요한 세포라는 것이 입증되었고⁴⁻⁷⁾, 이들 세포의 선택적인 이주와

증식을 이용하는 조직재생유도술이 개발되었다. 이러한 조직재생유도술은 임상적으로 긍정적인 연구결과가 보고⁸⁻¹⁰⁾되고 있음에도 불구하고 비흡수성 차폐막을 이용하게 됨으로써 이차수술이 필요하게 되고 이는 환자에게 주는 불편감 뿐만 아니라 치유기간의 장기화로 인한 염증발생과 치은퇴축 가능성 증대등의 단점이 대두되었으며, 이러한 문제점을 해결하기 위하여 흡수성 차폐막을 이용한 조직재생유도술¹¹⁻¹²⁾이 나오기에 이르렀다.

최근 세포생물학의 발전으로 세포의 이주, 부착 및 증식을 조절하는 성장인자들에 대한 연구에 많은 발전이 있었다. 특히 재생되는 세포의 증식속도를 촉진함으로써 선택적인 조직증식을 유도할 수 있다는 가능성이 제시되었다. 이들 성장인자중 Platelet-derived growth factor(PDGF), Epidermal growth factor(EGF), Insulin-like growth factor(IGF), Fibroblast growth factor(FGF), Transforming growth factor- α 및 β (TGF- α 및 TGF- β)등이 치주창상치유에 관여하는 것으로 알려졌다¹³⁻¹⁵⁾.

지지결합조직과 골격을 형성하는 간엽기원 세포들의 활성을 촉진시키는 것으로 보고된¹⁶⁾,¹⁷⁾ 혈소판유래성장인자(PDGF)는 in vitro에서 강력한 세포증식 촉진효과를 지니고 결합조직

세포에 대해 화학주성물질로 작용하며 교원질 합성을 촉진시키고, 생체내에서도 교원질 합성을 증진시키며 세포성분이 증가된 육아조직 형성을 보이는 것으로 알려져 있다^{18~21)}.

또한 상피성장인자(EGF)는 in vitro에서 상피세포, 내피세포 및 중배엽 기원 세포를 포함하는 다양한 세포들에 대해 DNA합성과 세포성장을 촉진하고²²⁾ 골흡수를 촉진하며, 교원질 합성과 alkaline phosphatase 활성을 억제한다고 알려져 있다^{23~26)}. 생체내에서도 잘 조직화된 육아조직을 유도하고²⁷⁾ 섬유아세포 증식을 촉진시킴으로써 창상치유를 증진시키며²⁸⁾, 절치맹출, 폐성숙과 같은 발육과정도 촉진하는 것으로 보고된 바 있다^{16, 29, 30)}.

한편 Matsuda등(1992)³⁰⁾은 in vitro에서 백서 치주인대 섬유아세포양 세포에 여러가지 성장인자를 적용하여 PDGF-BB가 강력한 세포증식과 화학주성을, PDGF-AB가 교원질합성을 촉진시킨다고 하였으며 IGF-I과의 상승작용을 보고하였다. Lynch등(1989)³¹⁾은 PDGF와 IGF-I을 혼용하여 신생골과 백악질 형성을 보고하였으며 Blom등(1994)³²⁾은 백서 치주인대 섬유아세포양 세포에 EGF, PDGF, FGF를 적용하여 세포변형없이 DNA합성이 증가되었음을 보고하였다.

현재까지 알려진 치주조직 재생기전은 치주인대세포의 증식으로 결손부가 채워지고 백악질과 치조골에 접합하면 각각의 소요조직으로 분화되는 과정이라고 알려져있다. 본 연구는 최근 연구가 활발히 진행되고 있는 PDGF와 EGF가 치주조직 재생의 최종단계인 골형성까지의 과정에 미치는 영향을 규명하고, 특히 현재까지 밝혀진 in vitro상의 실험결과에서 치주인대세포와 골세포의 증식 및 성장을 촉진한다고 밝혀졌으나 대부분의 연구에서 백서와 같은 소동물에서 배양한 세포를 대상으로 한 연구결과이고 고등동물의 세포를 대상으로 한 실험결과는 미미하여, 인체에 성장인자를 적용하기 전에 고등동물 세

포에서도 소동물의 연구결과와 동일한 경향을 얻을 수 있는가를 규명하고자 비글견의 치주인대세포와 골수세포를 대상으로 세포증식, 단백질합성 및 광물화과정등 세포성상에 미치는 효과를 연구하였다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 연구대상

연구대상으로는 생후 1년 6개월 이상되고 특이한 질병없이 전신건강이 양호하며 상하악 치열이 완전하고 실험동물용 예방접종이 완료된 평균 10~12Kg정도의 체중인 4마리의 순종 웅성 비글견(Marshall Co., U.S.A.)으로부터 초기배양한 치주인대세포와 골수세포를 대상으로 실험을 하였다.

2. 세포배양

① 치주인대세포의 배양

무치악 형성을 목적으로 비글견에 Pentobarbital Sodium(Tokyo Chemical Industry Co., Japan)을 체중 30mg/kg으로 산정, 복재정맥에 주사하여 전신마취시킨 후 Lidocaine HCl (Kwang Myung Pharm. Ind. Co. LTD., Korea)로 하악소구치부의 치조점막에 국소마취하고 통법에 따라 발거된 소구치중에서 제 2, 3, 4 소구치를 선정하여 부착된 치은조직과 치근의 치관측 및 치근측 1/3에 부착된 연조직을 제거하고 중앙에 부착된 연조직을 절취하여 직경 35mm의 배양접시에 고르게 분포시킨 다음 20% Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco, U.S.A.)과 100unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.5 μ g/ml amphotericin-B(Gibco, U.S.A.)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, U.S.A.)을 초기배양액으로 하여 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합 상태의 세포배양기 (Vision Scientific Co.,

Korea)에서 세포를 배양하였다.

치주인대세포가 조직절편으로부터 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층이 형성되면 0.05% Trypsin/0.02% EDTA를 처리하여 배양 접시로부터 세포를 박리하고 초기배양액에서 FBS를 10%로 감소함유시키고 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM/ml β -glycerophosphate를 첨가하여 이를 표준배양액으로 하였으며 1:3으로 분리 계대배양 하여 Beagle Dog Periodontal Ligament Cell (BPD) 이라 명명하고 본 실험에 사용하였다.

② 골수세포의 배양

비글견에서 치주인대세포의 배양을 위해 소구치 발치시 치은치조점막의 전층판막을 거상하고 bone trephine으로 하악체에서 골편을 채취하여 분쇄하고 세포배양액과 혼합하여 20 gauge needle로 물리적 힘을 이용하여 압박, 골파편을 포함한 세포부유액을 만든 다음 직경 35mm 배양접시에 균등 접종하여 상기와 동일한 방법으로 세포배양기에서 배양한다.

세포가 밀생상태에 도달하면 1:3으로 계대 배양하고 일부는 5% DMSO가 함유된 배양액에 분산하여 냉동후 액체질소 탱크내에 보관하였으며, 이때 배양된 세포를 Beagle Dog Bone Marrow Cell (BBM)로 명명하였다. 실험에 사용된 모든 배양액에는 10% FBS, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM/ml β -glycerophosphate 를 주입하였다.

③ 대조군과 실험군의 설정

배양세포에 성장인자를 전혀 투여하지 않은 경우를 대조군으로 하고 혈소판유래성장인자 (PDGF-BB, Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 10ng/ml의 농도로 투여한 PDGF투여군과 상피성장인자(EGF, Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 10ng/ml 투여한 EGF투여군을 실험군으로 하여 본 실험을 실시하였다.

3. 세포 증식을 측정

BPD와 BBM을 각각 1.5×10^5 cells/ml이 되도록 하여 대조군, PDGF투여군, EGF투여군에 각각 15개씩 총 45개의 35mm 배양접시에 세포를 접종하고 실험군에는 세포가 완전히 부착완료한 1일 후부터 성장인자를 주입하고 동일상태에서 배양한 후 1, 5, 9, 13, 17일째에 0.05% Trypsin/EDTA 를 이용하여 증식된 세포를 박리한 후 0.4% Trypan blue로 염색하였다. BPD와 BBM에 대하여 설정된 예정일에 각군에서 3개씩의 배양접시로부터 세포를 박리한 후 hemocytometer에 20 μ 흡수시키고 상하 sector를 8개로 구분하여 독립현미경 (Model CK2, Olympus Co., Japan) 하에서 각 세포수를 측정하고 이를 평균하였다.

4. 단백질 합성능 측정

단백질 합성능의 측정은 Bio-Rad Protein Assay kit를 사용하여 측정하였다. 세포 증식을 측정에서와 동일한 방법으로 BPD와 BBM에 대하여 각군 15개씩 총 45개의 35mm 배양접시에 세포를 각각 1.5×10^5 개씩 분주하고 표준배양액과 성장인자를 함유한 조건배양액으로 구분하여 배양하였다.

배양 1, 5, 9, 13, 17일에 각군 3개씩의 배양 접시로부터 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 0.1M PBS 1ml을 넣고 police scraper로 세포를 박리하여 Pasteur pipette로 세포부유액을 만든다.

Dye reagent를 deionized water로 1:4 비율로 희석하여 Whatman #1 filter로 여과한다. 1.39mg/ml의 bovine serum albumin을 이용하여 표준곡선을 먼저 측정한 후 세포부유액 900 μ 를 취하여 100 μ 의 10% Triton X-100를 첨가 vortex하여 ependorf tube에 넣어 15,000rpm으로 10분 원침하고 상층액을 취하여 dye reagent와 반응시킨 후 UV-VIS

spectrophotometer(UV-1201, Shimatzu, Japan)로 595nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 기준으로 판정하였다.

5. Alkaline phosphatase 활성도 측정

세포 증식율 측정에서의와 동일한 방법으로 BPD와 BBM에 대하여 각군 15개씩 총 45개의 35mm 배양접시에 세포를 각각 1.5×10^5 개씩 분주하고 표준배양액과 성장인자를 함유한 조건배양액으로 구분하여 배양하였다. 배양 1, 5, 9, 13, 17일에 각군 3개씩의 배양접시로 부터 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 0.1M PBS 1ml을 넣고 police scraper로 세포를 박리하여 Pasteur pipette로 세포부유액을 만든 후 900 μ 를 취하고 4 $^{\circ}$ C를 유지하면서 100 μ 의 10% Triton X-100를 첨가하여 30분 동안 5분간격으로 vortex하고 ependorf tube에 넣어 15,000rpm으로 10분 원침하고 상층액을 취하여 Alkaline phosphatase activity 측정용 시약(AL-P.P.K. Kit. Young Dong Chemicals, Korea)과 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer (UV-1201, Shimatzu, Japan)으로 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 연구성적

1. 세포증식율 측정

치주인대세포와 골수세포에 성장인자를 넣지 않은 대조군, PDGF 10ng/ml, EGF 10ng/ml를 첨가한 실험군을 배양 1, 5, 9, 13, 17일에 세포수를 측정하여 세포증식율을 비교하였다. 치주인대세포에서 초기 접종 세포수는 1.5×10^5 cells/ml였으나 대조군의 경우 1일과 13일째에 각각 1.7×10^5 , 6.8×10^5 cells/ml, PDGF투여군의 경우 각각 2.0×10^5 , 12.2×10^5 cells/ml, EGF투여군의 경우 각각 1.8×10^5 , 9.2×10^5 cells/ml로서 17일까지 그 차이가 점점 증대되는 양상을 보였으며 최종에는 대조군은 약 5.1배, PDGF투여군은 약 8.3배, EGF투여군은 약 6.5배 정도의 증가를 나타냈다. 대조군에 비하여 전 실험기간을 통하여 PDGF투여군에서 증식율이 현저히 증가하였으며, EGF투여군에서는 다소 빠르게 세포가 증식되었다(표 1, 그림 1). 골수세포에서도 마찬가지로 초기 접종 세포수는 1.5×10^5 cells/ml였으나 대조군의 경우 1일과 13일째에 각각 2.1×10^5 , 7.4×10^5 cells/ml, PDGF투여군의 경우 각각 2.2×10^5 , 12.8×10^5 cells/ml, EGF투여군의 경우 각각 2.1×10^5 , 9.8×10^5 cells/ml로서 17일까지 그 차이가 점점 증대되는 양상을 보였으며 최종에는 대조군은 약 5.9배, PDGF투여군은 약 8.8배, EGF투여군은 약 7.0배 정도의 증가를 나타내어 치주인대세포에서의와 동일한 양상을 보였다(표 2, 그림 2). 두세포 모두에서 각군 공히 배양시간이 경과함에 따라 세포수가 증가추이를 보이고, 배양 5일까지 세포증식이 매

표 1. Effect of growth factors on the proliferation of beagle dog's periodontal ligament cells

day\group	control	PDGF	EGF
1	17.46 \pm 0.59	19.71 \pm 0.56	18.25 \pm 0.45
5	47.38 \pm 0.25	86.63 \pm 1.44	65.38 \pm 1.63
9	58.75 \pm 2.06	105.54 \pm 2.95	74.29 \pm 2.34
13	67.67 \pm 2.15	121.92 \pm 0.61	92.21 \pm 1.13
17	77.05 \pm 1.77	125.67 \pm 1.09	97.96 \pm 1.66

Cell numbers : (Mean value S.D.) X 10^4

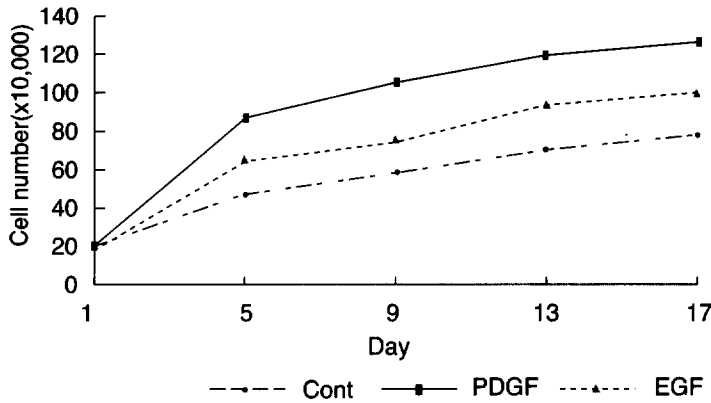


그림 1. Effect of growth factors on the proliferation of beagle dog's periodontal ligament cells.
Cell numbers: (Mean value S.D.) $\times 10^4$'s

표 2. Effect of growth factors on the proliferation of beagle dog's bone marrow cells

day\group	control	PDGF	EGF
1	20.59 \pm 0.31	22.04 \pm 0.26	21.38 \pm 0.25
5	54.71 \pm 2.08	97.71 \pm 1.42	73.84 \pm 1.63
9	65.59 \pm 1.78	113.21 \pm 1.19	84.46 \pm 2.03
13	74.25 \pm 1.62	128.13 \pm 1.56	98.21 \pm 2.32
17	88.09 \pm 1.16	132.09 \pm 0.88	104.25 \pm 1.62

Cell numbers : (Mean value S.D.) X 10⁴

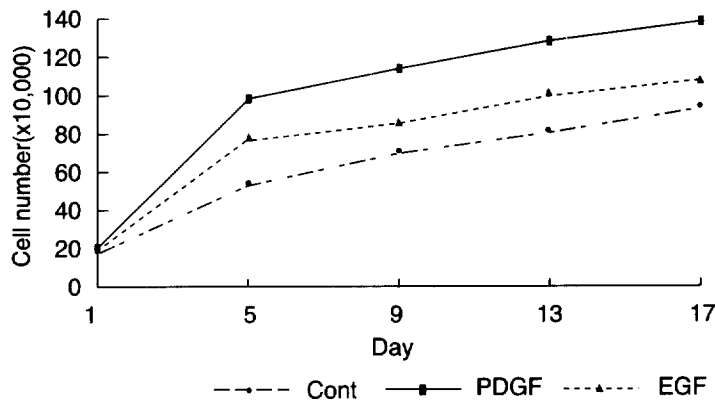


그림 2. Effect of growth factors on the proliferation of beagle dog's bone marrow cells
Cell numbers : (Mean value \pm S.D.) X 10⁴

우 빠르게 진행되었으며 이후 완만한 증가를 나타내었다.

2. 단백질 합성능 측정

치주인대세포에서 단백질 양은 배양 1일에 대조군, PDGF투여군, EGF투여군이 각각 0.2025, 0.2203, 0.2106mg/ml였으나 17일째에는

0.6281, 0.7979, 0.6928mg/ml로 모두 시간 경과에 따라 단백질량이 증가했으며, 대조군에 비해 PDGF투여군에서는 더 많은 증가를 보였다 (Table 3, Fig 3). 골수세포에서도 배양 1일에 대조군, PDGF투여군, EGF투여군이 각각 0.2383, 0.2562, 0.2443mg/ml였으나 17일째에는 0.6808, 0.9294, 0.7320mg/ml로 시간 경과 및 성장인자에 대한 반응이 치주인대세포에서와 유

표 3. Effect of growth factors on the protein production of beagle dog's periodontal ligament cells

day\group	control	PDGF	EGF
1	0.2025	0.2203	0.2106
5	0.4531	0.5856	0.4955
9	0.5121	0.6637	0.5483
13	0.6021	0.7752	0.6553
17	0.6281	0.7979	0.6928

Protein production units : (Mean) mg/ml

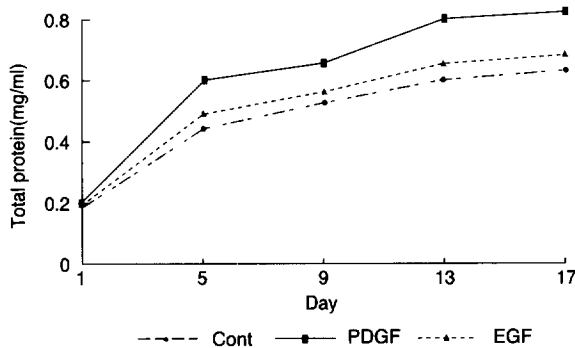


그림 3. Effect of growth factors on the protein production of beagle dog's periodontal ligament cells

Protein production units: (Mean) mg/ml

표 4. Effect of growth factors on the protein production of beagle dog's bone marrow cells

day\group	control	PDGF	EGF
1	0.2383	0.2562	0.2443
5	0.5320	0.6549	0.5620
9	0.5734	0.7396	0.5953
13	0.6677	0.9017	0.7073
17	0.6808	0.9294	0.7320

Protein production units : (Mean) mg/ml

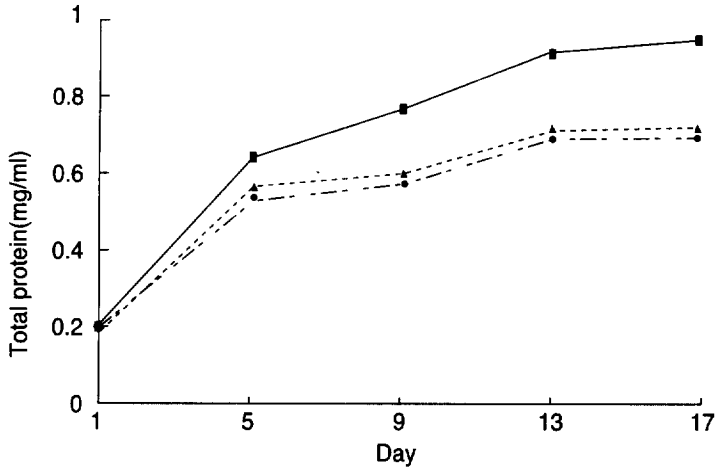


그림 4. Effect of growth factors on the protein production of beagle dog's bone marrow cells
Protein production units : (Mean) mg/ml

사한 양상이 관찰되었으며, 치주인대세포에 비하여 전반적으로 높은 합성소견을 보였다 (표 4, 그림 4).

3. Alkaline phosphatase 활성도 측정

치주인대세포에서 Alkaline phosphatase 활성도는 배양 1일에 대조군, PDGF투여군, EGF투여군이 각각 0.1177, 0.1181, 0.1169였으나 13일째에는 0.1363, 0.1645, 0.1349로 모두 배양기간이 경과함에 따라 대조군과 실험군 공히 전반적으로 증가하였는데, 9일과 13일째에 높은

증가율을 나타내었다. PDGF투여군에서는 대조군에 비하여 더 높은 활성도를 보였고 EGF투여군은 대조군과 유사하였다. 골수세포에서도 배양 1일에 대조군, PDGF투여군, EGF투여군이 각각 0.1186, 0.1190, 0.1184였으나 13일째에는 0.1558, 0.1832, 0.1323으로 치주인대세포에서와 유사하게 배양기간에 따른 변화를 나타내었고, PDGF투여군에서 13일째에 제일 높은 활성을 보였으며, EGF투여군에서는 배양 9일 이후 전반적으로 미약한 감소경향을 나타내었다(표 5, 6, 그림 5, 6).

표 5. Effect of growth factors on the alkaline phosphatase activity of beagle dog's periodontal ligament cells

day\group	control	PDGF	EGF
1	0.1177	0.1181	0.1169
5	0.1197	0.1214	0.1187
9	0.1271	0.1379	0.1216
13	0.1363	0.1645	0.1349
17	0.1354	0.1576	0.1310

Units : Mean optical density at 500nm

표 6. Effect of growth factors on the alkaline phosphatase activity of beagle dog's bone marrow cells

day\group	control	PDGF	EGF
1	0.1186	0.1190	0.1184
5	0.1213	0.1249	0.1208
9	0.1386	0.1496	0.1353
13	0.1558	0.1832	0.1323
17	0.1524	0.1623	0.1294

Units : Mean optical density at 500nm

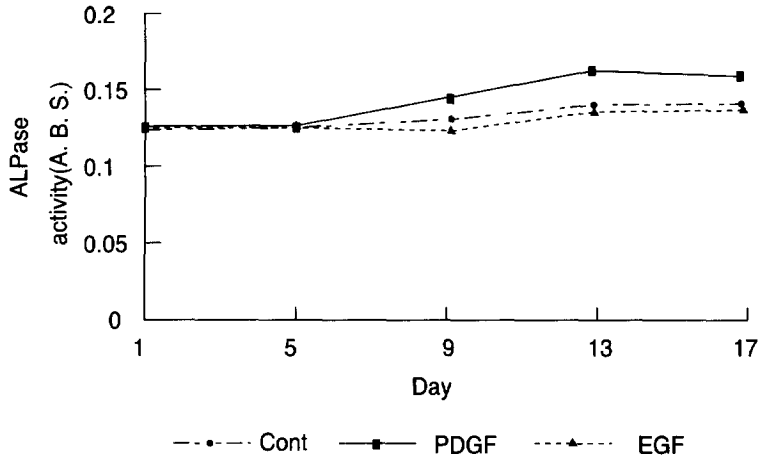


그림 5. Effect of growth factors on the alkaline phosphatase activity of beagle dog's periodontal ligament cells
Units : Mean optical density at 500nm

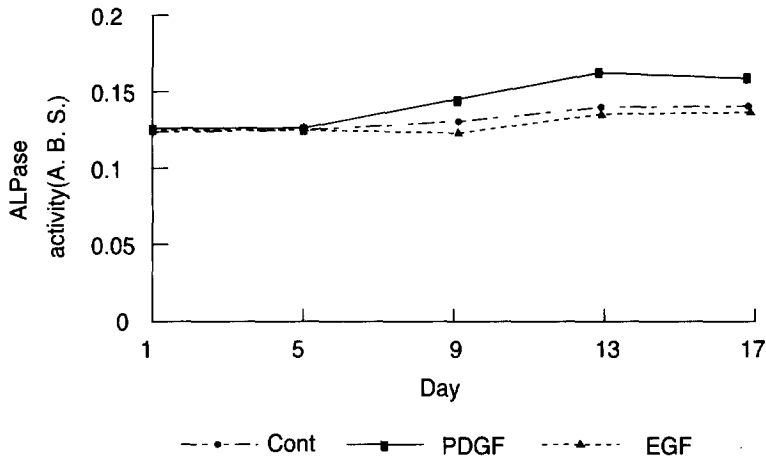


그림 6. Effect of growth factors on the alkaline phosphatase activity of beagle dog's bone marrow cells
Units : Mean optical density at 500 nm

IV. 총괄 및 고찰

치주재생은 치주인대, 백악질, 치조골, 치은상피 및 결합조직과 같은 치아 지지조직의 치유를 필요로하는 복잡한 현상으로 성공적인 치주재생에서 보다 중요한 것은 이들 조직의 순서적인 일련의 치유를 필요로 한다고 하겠다. 치주창상의 초기에 잔존치주인대와 골에

서 유래한 전구세포들이 결손부의 혈병, 혈청, 염증세포들로부터 나온 mitogen에 대한 반응으로 증식하며 새로 분열한 치주인대 섬유아세포중 일부는 치근면을 따라 치관부로 이주하여 치근면에 섬유성 결합조직 형성을 시작하고 골에서 유래한 세포들은 골표면에 신생 결합조직을 형성하는데 관여한다. 따라서 초기단계에서는 치주인대세포의 이주 및 증식과

이들에 의한 기질요소의 합성으로 빠른 치주인대 재생이 필요하며 치주재생의 후기에서는 조백악세포와 조골세포의 분화가 신생백악질과 골형성을 위해서 필요하다는 것은 이미 주지하고 있는 사실이다.

치주인대세포는 세포외기질요소들의 효율적인 합성활동을 제공하는 잘 조직화된 세포성기구를 가지며 고도의 세포극성을 띠고 교원질 합성이 왕성하며 높은 alkaline phosphatase 활성도를 가지고 조골적 성격과 백악질 형성에 관여하는등 치주창상 치유에 가장 중요한 세포이다. 그러나 치주인대와 골에서 유래한 섬유아세포양 세포 중 어느 것이 조백악세포와 조골세포로 각각 치유 후반기에 분화하는지는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다.^{33, 34)}

이러한 세포들의 이주, 증식, 분화등과 같은 세포활성에 영향을 주는 것으로 밝혀진 성장인자들은 몇가지 공통점을 보이는데 첫째 polypeptides로 매우 친화성이 높은 세포막 수용기에 결합함으로써 영향을 주며, 둘째 대부분 국소적으로 작용하고 paracrine이나 autocrine으로 작용하는 것으로 알려져 있다. Paracrine factor는 어떤 세포에서 생성되어 다른 세포를 촉진시키며 autocrine factor는 어떤 세포에서 생성되어 그 자신을 촉진시킨다. Paracrine factor는 목표세포가 생산세포에 매우 근접하여 위치하며 확산에 의해 목표세포에 도달하는 반면 endocrine factor는 대개 혈관계를 통하여 목표세포에 전달된다는 점이 다르다. 셋째 이들 성장인자의 생산은 정상세포에서 transcription, translation, 및 posttranslational modification/activation을 포함하는 몇몇 단계에서 조절되는 것으로 보인다. 네째 이들은 증식촉진활성과 더불어 세포의 이주, 분화와 같은 많은 다른 세포활성에도 영향을 주며, 다섯째 생체내에서 성장인자들의 효과는 여러 성장인자들의 조합된 축적효과로 나타나는 것으로 보고되었다.³⁵⁾

앞서 언급한 성장인자의 효과는 세포막 표

면의 고유수용기에 결합하여 internalization됨으로써 그 효과를 나타내는데 그 중 EGF와 이의 수용기의 분포와 표현에 대한 연구³⁶⁻³⁹⁾가 많이 진행되었으며 구강내에서는 부위와 세포종류에 따라 다르게 나타나는 것으로 보고되었다⁴⁰⁻⁴³⁾.

본 연구에서는 비글전의 치주인대세포와 골수세포를 대상으로 PDGF와 EGF가 이들의 세포활성에 미치는 영향을 연구하여 실제로 치주창상 치유시에 이용할 수 있는가하는 가능성에 대해 평가하는데 그 목적을 두었다.

PDGF의 동정은 섬유아세포에 대한 혈청내 일차적인 mitogen임을 밝힌 Antoniades등(1982)¹⁶⁾과 사람의 혈소판에서 이를 동정한 Ross등(1974)⁴⁴⁾, Kohler와 Lipton(1974)⁴⁵⁾에 의해 이루어졌다. PDGF는 분자량이 28,000~35,000Da이며 높은 양전하를 띠는 비교적 잘 알려진 단백질로서⁴⁶⁻⁴⁹⁾ 2 disulfide-bonded polypeptide chain(A,B)으로 구성되어 있고 56%가 동질성이다.^{50, 51)} 사람의 혈소판에서 동정된 PDGF는 2개의 PDGF gene product로 homodimer(PDGF-AA, PDGF-BB) 또는 heterodimer(PDGF-AB)로 구성되어 있으며 heterodimer가 많으며^{50, 52)} 혈소판의 alpha-granule외에도 단핵구, 대식세포, 섬유아세포, 내피세포 및 골기질을 포함한 다양한 세포 및 조직에서 분비된다고 알려져 있다.⁵³⁻⁵⁶⁾

PDGF는 섬유아세포, 신경교세포, 평활근, 조골세포 및 치주인대세포와 같은 지지결합조직과 골격을 형성하는 간엽기원 세포들의 활성을 촉진시키는 것으로 보고되었다^{16, 17)}. PDGF-AB와 PDGF-BB는 비슷한 증식촉진작용과 강도를 갖는데 반해, PDGF-AA는 보다 미약하며 다른 활성 범주를 갖는데 이는 세포에 따라 존재하는 PDGF 수용기의 종류와 수의 차이때문으로 보인다.⁵⁷⁻⁶¹⁾ 실험실적 연구에서 PDGF는 강력한 세포증식 촉진효과를 지니고 결합조직세포에 대해 화학주성물질로 작용하며 교원질 합성을 촉진시키고 생체

내에서도 교원질 합성을 증진시키며 세포성분이 증가된 육아조직 형성을 보이는 것으로 알려져 있다^{18~21)}.

Cohen(1962)²⁰⁾이 처음 발견한 EGF는 53개의 아미노산으로 구성된 작고 열에 안정한 single-chain protein이다⁶²⁾. mouse-derived EGF는 6045Da, human-derived EGF는 약 5400Da의 분자량을 가지며, 37개의 아미노산 잔기(70%)가 동일하고 공통의 생물학적 기능을 보인다^{62~64)}. 이는 뇨와 타액선에 주로 많으며 Brunner's gland, 혈소판, 뇌척수액과 양수등에서도 존재한다³⁰⁾.

또한 in vitro에서 EGF는 상피세포, 내피세포 및 증배염 기원 세포를 포함하는 다양한 세포들에 대해 DNA합성과 세포성장을 촉진하고²²⁾ 생쥐 두개관배지와 백서 장골배지에서 골흡수를 촉진하며, 백서 organ system에서 교원질 합성과 alkaline phosphatase activity를 억제한다고 알려져 있다^{23~26)}.

생체내 창상치유에 대한 EGF의 영향에 관한 연구에서 Buckley등(1985)²⁷⁾은 육아조직에 EGF가 서서히 분비되면 보다 명확히 분화 배열된 조직이 형성되고 혈관의 내측성장이 증진되며, 세포성분의 증가, RNA, 교원질 및 glycosaminoglycans 합성이 증가된다는 것을 보고 하였다. Implant내에 주입된 EGF가 신생 교원질 형성은 약간 증가시키는데 비해, 섬유아세포 증식을 촉진시킴으로써 창상치유를 증진시킨다는 연구²⁸⁾와 생체내 각막상피, 피부와 구강점막의 각화를 증가시키는 사실도 밝혀졌으며^{15, 66)} 또한 precocious eyelid opening과 절치 맹출, 구개형성, 폐성숙과 같은 발육과정도 촉진하고 위산분비를 억제하는 것으로 나타났다^{16, 29, 31)}.

PDGF는 일종의 competence growth factor로 작용하며 이는 G0단계의 휴식기 세포를 G1단계의 cell cycle로 들어가게 하는데 비해, IGF와 같은 progression factor는 G1에서 S phase로 진행하도록 촉진하는데 세포에서 DNA합성이

일어나기 위해서는 이 과정이 필요하며¹⁶⁾ PDGF와 IGF는 상승작용을 하는 것으로 보인다. 또한 PDGF는 섬유아세포와 평활근세포들이 IGF-I을 생산하도록 유도할 수 있으며 이들 세포들은 PDGF에 자극된 후 자신의 progression factor를 제공할 수 있다는 보고가 있다^{67, 68)}. EGF도 비록 소량의 DNA를 합성하기 위해서는 계속적으로 배지에 제공되어야 하는데 IGF-I과 같이 progression factor로 작용하는 것 같다¹⁶⁾.

본 연구에서 사용한 PDGF와 EGF의 농도는 10ng/ml로 선학들의 많은 연구^{21, 25, 26, 38, 69~73)}에서 이미 많이 이용하였던 농도로서 DNA합성과 세포증식, 골흡수와 alkaline phosphatase 활성도와 같은 세포활성에 미치는 영향을 평가하는데 있어서 적절한 반응을 보이는 농도로 판단되어 이용하였다.

성장인자의 세포증식 촉진효과에 대한 연구로 Matsuda등(1992)²⁰⁾은 PDGF-BB가 백서 치주인대 섬유아세포양 세포에 강력한 증식촉진 효과를 보인다고 하였고, 사람의 치은 섬유아세포에 대한 PDGF의 증식촉진 효과가 생체내 bradykinin에 의해 억제된다는 McAllister등(1995)⁷³⁾과 PDGF와 TGF- β 가 치주인대세포와 치은 섬유아세포의 증식을 촉진한다고 한 Dennison등(1994)⁷⁴⁾도 PDGF가 치주인대세포에 대한 증식촉진 효과가 있다고 한 Oates등(1993)⁷⁵⁾과 같은 의견을 제시한 바 있다.

본 연구에서도 PDGF투여군의 치주인대세포에서 대조군에 비하여 현저한 증식 촉진을 보였으며 골수세포 역시 동일한 소견을 나타냈는데 이는 Canalis(1981)⁷⁶⁾, Kumegawa등(1983)⁷¹⁾, Hauschka등(1986)⁵⁶⁾, Canalis등(1989)⁷²⁾의 보고와 일치한다. 한편 EGF는 두 세포에서 모두 약간 세포증식을 촉진하였는데 이는 PDGF만큼 현저하지 않았으며, EGF가 미약한 증식촉진 효과를 보인다는 선학들의 보고^{21, 71, 73, 77)}와 일치하였다.

비록 증식촉진효과가 성장인자연구에서 관

심의 대상이긴 하지만 교원질 및 비교원성 단백질의 합성, alkaline phosphatase 활성과 같은 특이한 분화된 기능도 똑같이 중요하다. 본 연구에서는 PDGF투여군의 치주인대세포에서 단백질합성이 증가된 소견을 보였는데 이는 PDGF가 교원질 합성은 약간 증가시키지만 단백질합성에는 거의 영향을 미치지 않는다는 Matsuda 등(1992)²⁰⁾의 보고와는 다르다. 골수세포에서는 PDGF투여군이 대조군에 비하여 단백질합성이 증가되었는데, 이는 태생기 백서 두개관배지에서 같은 소견을 관찰한 Canalis(1981)⁷⁶⁾와 Pfeilschifter 등(1990)⁷⁸⁾의 결과와 일치하였다. 한편 EGF투여군에서도 단백질합성이 약간 증가되었는데, EGF를 투여한 골수세포에서 교원질 합성은 억제시키지만 단백질합성은 증가시킨다는 Kumegawa 등(1993)⁷¹⁾의 연구결과와 유사한 소견을 보였다.

이러한 세포증식과 단백질 합성의 증가는 시간의존형으로 반응을 나타냈는데 대조군에서도 비록 실험군에 비하여 그 정도는 낮았지만, 배양기간이 경과함에 따라 세포수의 증가 및 단백질합성이 증가되는 동일한 소견을 보였다. 이는 Canalis 등(1980)⁷⁹⁾이 태생기 백서 두개관을 기관 또는 개개 세포배양시 이들의 조건배양액에 DNA 합성을 촉진하고, cortisol이 존재하면 교원질합성을 촉진하는 성장인자가 함유되어 있다는 보고를 한 바 있는데, PDGF와 같은 성장인자를 외인성으로 첨가하지 않아도 세포증식 및 단백질합성이 증가하는 것을 배양시간에 따른 자연증가와 함께 부분적으로 설명할 수 있다고 하겠다.

Alkaline phosphatase는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 세포기질에 calcium phosphate 침착을 유도하는 효소로 광물화 과정에 중요한 기능을 하는 것으로 밝혀져 있다⁸⁰⁻⁸²⁾. 또한 alkaline phosphatase는 조골세포, 연골세포, 조상아세포 및 조백악세포와 같이 광물화조직을 형성하는 세포로 분화하는 것에 대한 조기 지

시자로 이용할 수 있다는 보고가 있다³⁸⁾. 따라서 치주인대세포에서 alkaline phosphatase 활성이 증가하면 조백악세포나 조골세포와 같이 광물화조직을 형성하는 세포로 세포분화가 증진된 것으로 볼 수 있다고 생각된다.

본 연구에서 PDGF투여군에서 두세포 모두 대조군에 비해 alkaline phosphatase 활성도가 증가되어 나타났는데, PDGF에 의하여 치주인대세포와 골수세포의 분화가 증진되었기 때문인지, 아니면 세포증식에 따른 활성의 증가인지는 확실하지 않다. 반면 EGF투여군에서는 대조군에 비하여 치주인대세포에서는 별 차이를 보이지 않았는데 반해 골수세포에서는 감소하는 소견을 나타내어 이전의 보고^{25, 38, 83)}와는 정도의 차이는 있지만 비슷한 결과를 보였다. 이러한 차이는 세포를 채취한 동물의 종, 세포의 종류, 세포의 passage 수, 밀생도, 세포배양을 위한 배지의 선택등에 의해 일부 영향을 받았기 때문으로 추정된다.

EGF가 광물화 조직을 형성하는 세포로 분화를 억제하여 치주인대세포에서 EGF-수용기의 up-regulation은 세포를 미분화상태로 유지하고 down-regulation은 조골세포나 조백악세포로의 분화와 관련되며^{37, 38)} 결과적으로 EGF/EGF-수용기 체계가 치주인대 섬유아세포의 표현형과 치주인대내에서 이들의 유지, 치주인대의 구조 및 치조골과 백악질 형성의 균형을 유지하는 것으로 보인다^{88, 84)}.

Owen 등(1990)⁸⁵⁾은 태생기 백서의 두개관에서 유래한 조골세포의 배양에서 증식기, 세포외기질 성숙기 및 광물화등 3개의 중요한 기간과 이 기간들 사이에 2개의 restriction point가 있음을 보고하였다. 즉 배양 초기에는 활동적으로 증식하고 fibronectin과 제 1형 교원질의 세포외기질을 생산하며 이러한 세포증식 활성이 감소되면서 기질 성숙과 광물화와 관련된 유전자가 유도되는데, 이러한 일련의 과정이 상호 기능적으로 연관된 관계를 보인다고 하였다. 즉 alkaline phosphatase 활성은 증

식기 말기에 나타나며 이는 조골세포배지에서 어떤 유의한 광물화과정에 선행되어 활성이 증가되어 나타난다고 하였다. 본 연구에서도 시간경과에 따라 배양 초기인 5일에는 세포증식율이 크게 증가하다가 점차 둔화되는 경향을 보이고 총단백질 합성도 유사한 경향을 보인 반면, alkaline phosphatase 활성은 배양 9일 이후부터 배양 13일까지 높은 증가를 보여 이들⁸⁵⁾의 배양기간 경과에 따른 변화와 유사한 결과를 나타냈다.

Lynch등(1987, 1989, 1991)^{31, 86-88)}은 일련의 연구를 통하여 PDGF와 IGF가 연조직 창상치유뿐만 아니라 titanium implant주위의 골재생에도 좋은 효과를 보인다고 하였고, Rutherford등(1992)⁸⁹⁾, Wang등(1994)⁹⁰⁾, Park등(1995)⁹¹⁾, Cho등(1995)³⁴⁾도 성장인자가 치주조직재생을 빠르게 촉진한다고 하여 임상적용에 대한 가능성에 대하여 긍정적으로 제시한 바 있다.

다양한 성장인자들의 단독 또는 배합사용으로 치주재생에 관여하는 세포들의 활성에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보여지나 보다 바람직한 치주재생을 얻기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 예컨대 IGF-I은 치주인대세포가 조골세포나 조백악세포로 조기분화를 유도하여 강직을 유도할 수 있으며⁸⁴⁾, PDGF만을 단독으로 적용했던 치주병소에서 강직이 많이 관찰되었다는³⁴⁾ 점에서 조골세포로의 분화를 down-regulation하고 강직을 억제할 수 있을 것으로 기대되는 EGF^{83, 84)}와 같은 성장인자와의 배합사용이 임상적용에 관심의 대상이 될 것으로 생각된다.

이상과 같이 본 연구결과를 종합하여 볼때 PDGF는 치주인대세포 및 골수세포 모두에서 세포증식, 단백질합성 및 alkaline phosphatase 활성과 같은 세포활성에 영향을 주는 반면 EGF는 대체로 그 작용이 미약하였으나 이들 성장인자를 적절히 이용하면 상실된 치주조직 재생을 유도하기 위한 보조적인 수단이 될 수

있을 것으로 기대되었다. 따라서 향후 PDGF와 EGF의 적절한 농도선택 및 배합, 적용시기와 방법등에 대한 연구와 백서, 가토, 성견, 인체등의 다양한 종으로 부터 배양된 세포를 대상으로 동일 성장인자에 대한 반응을 비교 검토할 필요가 있으며, 또한 이들의 생체내 작용효과에 대한 계속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

성장인자인 PDGF와 EGF가 치주조직 재생의 초기단계에서 중요한 역할을 하는 치주인대세포와 골수세포의 세포성상에 미치는 영향을 평가하기 위해 비글견을 대상으로 본 연구를 시행하였다. 대조군은 초기 접종 세포수를 1.5×10^5 cells/ml가 되도록 하고 10% FBS, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM/ml β -glycerophosphate가 포함된 DMEM에 성장인자를 주입하지 않은 것으로 하였으며 실험군은 동일한 배지조건에 10ng/ml PDGF 또는 10ng/ml EGF를 첨가한 것으로 하였다. 세포 배양 1, 5, 9, 13 및 17일째에 두 종류 세포에 대한 각군의 세포증식율, 총단백질 합성량 및 alkaline phosphatase 활성도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포증식율은 시일의 경과에 따라 치주인대세포와 골수세포 모두 PDGF투여군에서 가장 빠른 증식을 보였고, 다음이 EGF투여군, 대조군의 순이었다.
2. 단백질합성능은 PDGF투여군에서는 대조군보다 증가되었으나 EGF투여군에서는 큰 차이를 나타내지 않았다.
3. Alkaline phosphatase 활성도 역시 PDGF투여군에서는 두세포 모두에서 활성도가 증가되게 나타났으며, EGF투여군에서는 대조군과 비교시 다소 감소하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합하여보면 치주인대세포와 골수세포에 대한 PDGF의 효과는 증식과 총단백질 합성, alkaline phosphatase 활성도 등과 같은 세포활성에 영향을 주는 반면 EGF는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으며 이들을 적절히 사용하면 상실된 치주조직재생을 얻기 위한 술식에서 보조적 수단이 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ramfjord, S.P. and Nissle, R.R. : The modified Widman flap. *J. Periodontol.*, 45: 601-607, 1974.
- Yuktanandana, I. : Bone graft in the treatment of periodontal pocket in dogs. *J. Periodontol.*, 30: 17-26, 1959.
- Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissue. *J. Periodontol.*, 47: 256-260, 1976.
- Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., and Lindhe, J. : The regenerative potentials of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J. Clin. Periodontol.*, 9: 257-265, 1982.
- Magnusson, I., Nyman, S., Karring, T., and Egelberg, J. : Connective tissue attachment formation following exclusion gingival connective tissue and epithelium during healing. *J. Periodontal Res.*, 20 : 201-208, 1985.
- Caton, J.G., DeFuria, E.L., Polson, A.M., and Nyman, S. : Periodontal regeneration via selective cell population. *J. Periodontol.*, 58: 546-552, 1987.
- Aukhil, I. and Ighhaut, J. : Periodontal ligament cell kinetics following experimental regenerative procedures. *J. Clin. Periodontol.*, 15 : 374-382, 1988.
- Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Wennstrom, J. : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J. Clin. Periodontol.*, 13: 604-616, 1986.
- Pontoriero, R., Lindhe, J., Nyman, S., Karring, T., Resenberg, E., and Sanavi, F. : Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars. A clinical study. *J. Clin. Periodontol.*, 15 : 247-254, 1988.
- Caffesse, R.G., Smith, B.A., Duff, B., Morrison, E.C., Merrill, D., and Becker, W. : Class II furcations treated by guided tissue regeneration in human : Case reports. *J. Periodontol.*, 61: 510-514, 1990.
- Collins, B.R. and Magnusson, I. : New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membrane. *J. Periodontol.*, 59: 1-6, 1988.
- Blumenthal, N. and Steinberg, J. : The use of collagen membrane barriers in conjunction with combined demineralized bone collagen gel implant in human infrabony defects. *J. Periodontol.*, 61 : 319-327, 1990.
- Terranova, V.P. and Wikesjo, UME. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. *J. Periodontol.*, 58 : 371-380, 1987.
- Messadi, D.V. & Bertolami, C.N.: General principles of healing pertinent to the periodontal problem. *Dent. Clin. North Am.*, 35 : 443-457, 1991.
- Caffesse, R.G. and Quinones, C.R. : Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000., 1(1) :

- 69-79, 1993.
16. Antoniades, H.N. and Owen, A.J. : Growth factors and regulation of cell growth. *Annu. Rev. Med.*, 33 : 445-463, 1982.
 17. Hintz, R.L. and Liu, F. : Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 988-995, 1977.
 18. Westermarck, B. : The molecular and cellular biology of platelet-derived growth factor. *Acta. Endocrinol.*, 123 : 131-142, 1990.
 19. Deuel, T.F., Kawahara, R.S., Mustoe, T.A., and Pierce, G.F. : Growth factors and wound healing : platelet-derived growth factor as a model cytokine. *Annu. Rev. Med.*, 42 : 567-584, 1991.
 20. Matsuda, N., Lin, W.L., Kumar, N.M., Cho, M.I. and Genco, R.J. : Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J. Periodontol.*, 63 : 515-525, 1992.
 21. Sprugel, K.H., McPherson, J.M., Clowes, A.W., and Ross, R. : Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chamber. *Am. J. Pathology*, 129 : 601-613, 1987.
 22. Scott, J., Urdea, M., Quiroga, M., Sanchez-Pescador, R., Fong, N., Selby, M., Rutter, W.J., and Bell, G.I. : Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science*, 221 : 236-240, 1983.
 23. Tashjian, A.H., Voekel, E.F., Lazzaro, M., Singer, F.R., Roberts, A.B., Derynck, R., Winkler, M.E., and Levine, L. : Alpha and beta human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82 : 4535-4538, 1985.
 24. Ibbotson, K.J., Twardzik, D.R., D'Souza, S.M., Hargreaves, W.R., Todaro, G.J., and Mundy, G.R. : Stimulation of bone resorption by synthetic transforming growth factor- α . *Science*, 228: 1007-1009, 1985.
 25. Canalis, E. and Raisz, L.G. : Effect of epidermal growth factor on bone formation in vitro. *Endocrinology*, 104 : 862-869, 1979.
 26. Canalis, E. : Effects of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism*, 32 : 14-20, 1983.
 27. Buckley, A., Davidson, J.M., Kamerath, D.C., Wolt, T.B., and Woodward, S.C. : Sustained release epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 7340-7344, 1985.
 28. Laato, M., Kahari, V., Niinikoski, J., and Buorio, E. : Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes. *Biochem. J.*, 247 : 385-388, 1987.
 29. Cohen, S. : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J. Biol. Chem.*, 237 : 1555-1562, 1962.
 30. Marti, U., Burwen, S.J., and Jones, A.L. : Biological effects of epidermal growth factor with emphasis on the gastrointestinal tract and liver : an update. *Hepatology*, 9 : 126-138, 1989.
 31. Lynch, S.E., Williams, R.C., Polson, A.M., Howell, T.H., Reddy, M.S., Zappa, U.E.,

- and Antoniades, H.N. : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 545-548, 1989.
32. Blom, S., Holmstrup, P., and Dabelsteen, E. : A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cells' DNA synthesis and morphology. *J. Periodontol.*, 65(5) : 373-378, 1994.
 33. Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R.A., and Somerman, M.J. : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J. Periodontol.*, 62 : 499-503, 1991.
 34. Cho, M.I., Lin, W.-L., and Genco, R.J. : Platelet-derived growth factor- modulated guided tissue regeneration therapy. *J. Periodontol.*, 66 : 522-530, 1995.
 35. Graves, D.T. and Cochran, D.L. : Mesenchymal cell growth factors. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1 : 17-36, 1990.
 36. Modeer, T., Mendez, C., Dahllof, G., Anduren, I., and Andersson, G. : Effect of phenytoin medication on the metabolism of epidermal growth factor receptor in cultured gingival fibroblasts. *J. Periodontal Res.*, 25(2) : 120-127, 1990.
 37. Cho, M.I., Lin, W.L., and Garant, P.R. : Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat: A light and electron microscopic radioautographic study. *Anat. Rec.*, 231(1) : 14-24, 1991.
 38. Matsuda, N., Kumar, N.M., Ramakrishnan, P.R., Lin, W.L., Genco, R.J. and Cho, M.I. : Evidence for up-regulation of epidermal growth-factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype in vitro. *Arch. Oral Biol.*, 38(7) : 559-569, 1993.
 39. Lin, F. and Wise, G.E. : Effect of epidermal growth factor on expression of transforming growth factor-beta 1 mRNA in stellate reticulum cells of rat mandibular molars. *Dev. Dyn.*, 198(1) : 22-27, 1993.
 40. Irwin, C.R., Schor, S.L., and Ferguson, M.W. : Expression of EGF-receptors on epithelial and stromal cells of normal and inflamed gingiva. *J. Periodontal Res.*, 26(5) : 388-394, 1991.
 41. Nordlund, L., Hormia, M., Saxen, L., and Thesleff, I. : Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptors in human gingival epithelia. *J. Periodontal Res.*, 26(4) : 333-338, 1991.
 42. Tajima, Y., Yokose, S., Kashimata, M., Hiramatsu, M., Minami, N., and Utsumi, N. : Epidermal growth factor expression in junctional epithelium of rat gingiva. *J. Periodontal Res.*, 27 : 299-300, 1992.
 43. Whitcomb, S.S., Eversole, L.R., and Lindemann, R.A. : Immunohistochemical mapping of epidermal growth-factor receptors in normal human oral soft tissue. *Arch. Oral Biol.*, 38(9) : 823-826, 1993.
 44. Ross, R., Glomset, J.A., Kariya, B., and Harker, L. : A platelet-dependent serum factor that stimulates proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71 : 1207-1210, 1974.
 45. Kohler, A. and Lipton, A. : Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp. Cell Res.*, 87 : 297, 1974.
 46. Antoniades, H.N. : Human platelet-derived growth factor (PDGF) : Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of

- their reduced subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78 : 7314-7317, 1981.
47. Deuel, T.F., Huang, J.S., Proffitt, R.T., Baenzinger, J.U., Chang, D., and Kennedy, B.B. : Human platelet-derived growth factor. purification and resolution into two active protein fractions. *J. Biol. Chem.*, 256: 8896-8899, 1981.
 48. Heldin, C.H., Westermark, B., and Wasterson, A. : Platelet-derived growth factor: isolation by large-scale procedure and analysis of subunit composition. *Biochem. J.*, 193 : 907-913, 1981.
 49. Raines, E.W. and Ross, R. : Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J. Biol. Chem.* 257 : 5154-5160, 1982.
 50. Antoniades, H.N. and Hunkapiller, M.W. : Human platelet-derived growth factor (PDGF) : Amino terminal amino acid sequence. *Science*, 220: 963-965, 1983.
 51. Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M.S., Eddy, R., Shows, T.B., Philpott, K., Mellor, A.L., Knott, T.J., and Scott, J. : cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature*, 320 : 695-699, 1986.
 52. Hammacher, A., Hellman, U., Johnsson, A., Ostman, A., Gunnarsson, K., Westermark, B., Wasteson, A., and Heldin, C.H. : A major part of PDGF purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *J. Biol. Chem.*, 263: 16493-16498, 1988.
 53. Rappolee, D.A., Mark, D., Banda, M.I., Werb, Z. : Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo : analysis of mRNA phenotyping. *Science*, 241: 708-712, 1988.
 54. Antoniades, H.N., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., Kiritsy, C.P., and Lynch SE : Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PGDF receptor in RNA's in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88 : 565-569, 1991.
 55. Sitaras, N.M., Sariban, E., Pantagis, P., Zetter, B., and Antoniades, H.N. : Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and synthesize PGDF-like mitogen. *J. Cell. Physiol.*, 132 : 376-380, 1987.
 56. Hauschka, P.C., Mavrakos, A.E., Iafrazi, M.D., Doleman, S.E., and Klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix. *J. Biol. Chem.*, 261 : 12665-12674, 1986.
 57. Kazlauskas, A., Bowen-Pope, D., Seifert, R., Hart, C.E., and Cooper, J.A. : Different effects of homo- and heterodimers of platelet-derived growth factor A and B chains on human and mouse fibroblasts. *EMBO J.*, 7 : 3727-3735, 1988.
 58. Hart, C.E., Forstrom, J.W., Kelly, J.D., Seifert, R.A., Smith, R.A., Ross, R., Murray, M.J., and Bowen-Pope, D.F. : Two classes of PDGF receptors recognize different isoforms of PDGF. *Science*, 240 : 1529-1531, 1988.
 59. Heldin, C.H., Backstrom, G., Ostman, A., Hammacher, A., Ronnstrand, L., Rubin, K., Nister, M., and Westermark, B. : Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts : evidence for two separate receptor types. *EMBO J.*, 7 :

- 1387-1393, 1988.
60. Bowen-Pope, D. and Ross, R. : Platelet-derived growth factor. II. Specific binding to cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 257 : 5161-5171, 1982.
 61. Frackelton, J.A., Tremble, P.M., and Williams, L.T. : Evidence for platelet-derived growth factor-simulated tyrosine phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor in vivo. Immunopurification using a monoclonal antibody to phosphotyrosine. *J. Biol. Chem.*, 259 : 7909-7915, 1984.
 62. Harper, R.A., Pierce, J., and Savage, C.R. Jr. : Purification of human epidermal growth factor by monoclonal antibody affinity chromatography. *Methods Enzymol.*, 146 : 3-11, 1987.
 63. Savage, C.R., Inagami, T., and Cohen, S. : The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 247 : 7612-7621, 1972.
 64. Cohen, S. and Carpenter, G. : Human epidermal growth factor. isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72: 1317-1321, 1975.
 65. Savage, C.R. Jr and Cohen, S. : Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp. Eye Res.*, 15 : 361-366, 1973.
 66. Brown, G.L., Curtsinger, LIII., Brightwell, J.R., Ackerman, D.M., Tobin, G.R., Polk, H.C. Jr, George-Nascimento, C., Valenzuela, P., and Schultz, G.S. : Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J. Exp. Med.* 163 : 1319-1324, 1986.
 67. Clemmons, D.R., Underwood, L.E., and Van Wyk, J.J. : Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 67: 10-19, 1981.
 68. Clemmons, D.R. and Van Wyk, J.J. : Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedin-like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 75 : 1914-1918, 1985.
 69. Tashjian, A.H. Jr and Levine, L. : Epidermal growth factor stimulates prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85 : 966-975, 1978.
 70. Tashjian, A.H. Jr, Hohmann, E.L., Antoniadis, H.N., and Levine, L. : Platelet-derived growth factor stimulates bone resorption via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology*, 111 : 118-124, 1982.
 71. Kumegawa, M., Hiramatsu, M., Hatakeyama, K., Yajima, T., Kodama, H., Osaki, T., and Kurisu, K. : Effects of epidermal growth factor on osteoblastic cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.*, 35: 542-548, 1983.
 72. Canalis, E., McCarthy, T.L., and Centrella, M. : Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 140: 530-537, 1989.
 73. McAllister, B.S., Leeb-Lundberg, F., Mellonig, J.T., and Olson, M.S. : The functional interaction of EGF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.*, 66 : 429-437, 1995.
 74. Dennison, D.K., Vallone, D.R., Pinero, G.J.,

- Rittman, B., and Caffesse, R.G. : Differential effect of TGF-beta1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J. Periodontol.*, 65: 641-648, 1994.
75. Oates, T.W., Rouse, C.A., and Cochran, D.L. : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J. Periodontol.*, 64 : 142-148, 1993.
76. Canalis, E. : Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism*, 30(10): 970-975, 1981.
77. Antosz, M.E., Bellows, C.G., and Aubin, J.E. : Effects of transforming growth factor beta and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvarial cells. *J. Cell. Physiol.*, 140(2) : 386-395, 1989.
78. Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R.G.K., Minne, H.W., and Ziegler R : Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors : A comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor- β . *Endocrinology*, 127(1) : 69-75, 1990.
79. Canalis, E., Peck, W.A., and Raisz, L.G. : Stimulation of DNA and collagen synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvaria. *Science*, 210: 1021-1023, 1980.
80. Anderson, H.C. : Mechanism of mineral formation in bone. *Lab. Invest.*, 60: 320-330, 1989.
81. Beertsen, W. and Theo Van Den Bos : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum : The role of alkaline phosphatase. *Matrix*, 9: 159-171, 1989.
82. Bellows, C.G., Aubin, J.E., and Heersche, J.N.M. : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral*, 14: 27-40, 1991.
83. Centrella, M., Massague, J., and Canalis, E. : Human platelet-derived transforming growth factor- β stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinol.*, 119: 2306-2312, 1986.
84. Cho, M.I., Matsuda, N., Ramakrishnan, P.R., Lin, W.-L., and Genco, R.J. : Differential regulation of periodontal ligament cell activities by platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor I and epidermal growth factor. Molecular pathogenesis of periodontal disease. Genco et al Ed. *Am. Society for microbiology*, Washington DC 20005, pp 403-414, 1994.
85. Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., and Stein, G.S. : Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.*, 143 : 420-430, 1990.
86. Lynch, S.E., Nixon, J.C., Colvin, R.B., and Antoniades, H.N. : Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effect with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:7696-7700, 1987.
87. Lynch, S.E., Colvin, R.B., and Antoniades, H.N. : Growth factors in wound healing. single and synergistic effects on partial

- thickness porcine skin wounds. *J. Clin. Invest.*, 84 : 640-646, 1989.
88. Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A., Weber, H.P., Stich, H., Fox, C.H., and Williams, R.C. : Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol.*, 62 : 710-716, 1991.
89. Rutherford, R.B., Nierkrash, C.E., Kennedy, J.E., and Charette, M.F. : Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J. Periodontal Res.*, 27 : 285-290, 1992.
90. Wang, H.L., Pappert, T.D., Castelli, W.A., Chiego, D.J.Jr, Shyr, Y., and Smith, B.A. : The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium : an autoradiographic study on dogs. *J. Periodontol.*, 65 : 429-436, 1994.
91. Park, J.B., Matsuura, M., Han, K.Y., Norderyd, O., Lin, W.-L., Genco, R.J., and Cho, M.I. : Periodontal regeneration in Class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J. Periodontol.*, 66 : 462-477, 1995.

Effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the characteristics of beagle dog's periodontal ligament and bone marrow cells

Byeong-Do Cho, Yeek Herr, Joon-Bong Park, Young-Hyuk Kwon, Man-Sup Lee
Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung-Hee University

This study was performed to evaluate the effects of platelet-derived growth factor (PDGF) and epidermal growth factor (EGF) on the characteristics of beagle dog's periodontal ligament (BPD) cells and bone marrow (BBM) cells which have the important role on the early stage of periodontal tissue regeneration in vitro. In control group, the cells (1.5×10^5 cells/ml) were cultured alone with Dulbecco's Modified Eagle's Medium contained with 10% fetal bovine serum, 50 μ g/ml ascorbic acid, and 10mM/ml β -glycerophosphate. In experimental groups, growth factors, PDGF or EGF (10ng/ml), were added into the above culture condition. And then each group was characterized by examining the cell proliferation rate, amount of total protein synthesis, alkaline phosphatase activity at 1, 5, 9, 13, 17th day after seeding of cells into the culture wells.

The results were as follows:

1. Both BPD and BBM cells in PDGF-treated group proliferated more rapidly than non-treated cells. This finding also was observed in EGF-treated group but it was not as prominent as that of PDGF-treated group. The proliferation rates of both cells showed the time-dependent pattern during experimental periods in all three groups.
2. Amount of total protein synthesis was more increased in PDGF-treated group than in control group. But no significant difference between EGF-treated group and control group was observed throughout experimental periods even though the tendency of amount of protein synthesis was time-dependent pattern.
3. Alkaline phosphatase activity also more increased in PDGF-treated group than control group. But slight decrease tendency was seen in both cells of EGF-treated group.

From the above results, PDGF appeared to enhance the proliferation and cellular activities including amount of total protein synthesis and alkaline phosphatase activity of BPD and BBM cell, but EGF did not show notable effects. The optimal application of these growth factors was thought to be useful as the adjunctive means in periodontal regeneration procedures.