

PDGF-BB 적용시간이 decalcified dentin에서의 치은섬유아세포의 증식에 대한 효과

박진우 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

1. 서론

치주조직의 재생은 치주질환으로 인해 상실된 부착기구들이 신생골, 신생백악질과 함께 새로운 치주인대 섬유가 기능적으로 삽입, 배열되어 재형성된 상태를 말한다^{1, 2)}. 현재까지 치주조직의 재생을 위해 사용된 술식으로는 이환된 병소부의 단순제거, 약제의 치근면처리법, 골조직이식술, 조직유도재생술 등 다양한 방법들이 제시되었으나 대부분 치주조직의 재생보다는 회복의 치유양상을 나타내었다³⁾. 치주조직의 재생이 일어나기 위해서는 치주인대내에 있는 미분화된 전구세포들이 노출된 치근면에 이주, 부착, 증식하여 조직화된 치주조직의 부착기구를 형성하며, 마찬가지로 골의 전구세포도 이주, 증식하여 재생된 치주인대와 함께 성숙되어야 한다⁴⁻⁶⁾.

Terranova와 Wikesjo⁷⁾는 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포의 기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자에 의해 조절되며 폴리펩타이드계 성장인자가 치주조직재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라고 시사하였다. 창상치유에 관여하는 성장인자로서 혈소판유래성장인자(이하 PDGF

로 표기), 섬유아세포성장인자, 변형성장인자, 인슐린유사성장인자, 상피성장인자 등이 있으며⁸⁾, 이 중 PDGF는 분자량이 28~35kDa의 조절성 단백질로서^{9, 10)} 단종이량체(PDGF-AA, BB)와 이종이량체(PDGF-AB)로 존재함이 발견되었고¹¹⁾, 혈소판의 α -granule로부터 유리된다고 알려져 있다¹²⁾. 혈소판이외에 단핵세포 및 대식세포, 섬유아세포, 내피세포, 골기질등으로부터 분리된다고 알려져 있으며, 중배엽의 세포 즉 섬유아세포, 신경세포, 평활근세포, 골세포를 조절하는데 중요하다고 알려져 있다^{13, 14)}. 이러한 PDGF는 중성구, 단핵세포 그리고 섬유아세포에 대해 화학주성이 있으며^{15, 16)}, fibronectin, 교원질분해효소 그리고 다른 성장인자들의 합성을 포함하는 창상치유과정에 있어서 주된 역할을 하는 이들 세포들을 자극시킨다고 알려져 있다^{17, 18)}.

시험관적 실험에서 Rutherford 등¹⁹⁾은 PDGF가 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포의 증식을 촉진하였다고 보고하였고, Matsuda 등²⁰⁾은 배양된 쥐의 치주인대세포에 PDGF적용시 세포의 증식, 화학주성, 교원질합성을 증가시킨다고 보고하였으며 Oates 등²¹⁾은 PDGF가 사람의 치주인대세포

에 주된 유사분열촉진인자로 작용한다고 주장하였다.

생체실험에서 Lynch 등^{22, 23)}은 돼지의 피부창상부위에 PDGF적용시 적용농도에 따라 신생결체조직과 내피층의 두께가 증가됨을 관찰하였고, IGF-1과 함께 투여시 PDGF 단독투여보다 더 많은 양의 신생결체조직이 형성됨을 보고하였으며, PDGF와 IGF-1혼합사용이 Implant주위의 골재생에도 효과가 있다고 보고하였다^{24, 25)}. Rutherford 등²⁶⁾은 원숭이에서 실험적으로 유도된 치주염의 치료방법으로 PDGF와 IGF-1혼합사용시 백악질, 치주인대등의 재생과 신부착이 일어남을 관찰할 수 있었음을 보고하였으며, 조와 박²⁷⁾은 개에서 실험적으로 야기된 치근이개부병변에 PDGF단독적용시 전체적으로 조직재생의 속도가 빠르고 치유양상도 치주조직 고유형태로 변화, 진행됨이 관찰되었다고 보고하였다.

생체실험에서 사용된 성장인자의 적용방법으로는 methyl cellulose gel^{24~26)}이나 bovine bone type I collagen²⁸⁾같은 매개체와 혼합하여 사용하거나 성장인자를 치근면에 직접 도포^{27, 29)} 또는 탈회된 치근면을 주적용부위로 사용하는 방법^{30, 31)} 등이 보고되어지고 있다. 이중 methyl cellulose gel과 성장인자를 혼합하여 사용시 성장인자의 반감기가 3~4.2시간으로 적용 4일 후에는 96%이상이 제거되었다고 보고되어지고 있으며²⁵⁾, insoluble collagen을 함유매개체로 사용시 새로운 치주조직의 재생을 방해하는 이물질로 작용할 수 있는 단점을 가질 수 있다고 하며³⁰⁾ 조와 박²⁷⁾의 실험에서 PDGF를 collagen, tricalcium phosphate를 함유매개체로 이개부병변에 사용한 경우보다 치근면에 도포한 경우에서 치주조직고유형태로 치유양상이 변화, 진행됨을 관찰할 수 있었다고 보고하였다.

Terranova 등^{32, 33)}이 치주조직의 치유와 관련된 생물학적 거대분자들이 상아질상에 흡

착될 수 있다는 것을 보고한 이래, 탈회된 치근면이 상아질-연조직경계부의 치유에 중요한 역할을 할 수 있는 특정세포의 부착과 증식을 유도하는 물질들의 결합을 증진시키는 것으로 밝혀졌는데, 테트라사이클린으로 상아질면을 전처리시 내피세포성장인자의 결합이 증가하여 치주인대세포의 이주와 증식을 촉진시킨다고 보고하였고, 탈회시 염기성섬유아세포성장인자와 탈회로 인해 노출된 type I collagen과의 결합으로 인하여 상아질면에 대한 성장인자의 결합이 비탈회시보다 2.5배 정도 더 증가하였다고 보고하였다³⁴⁾. Cho 등³⁰⁾은 탈회된 치근면을 PDGF적용의 주매개체로 사용할 경우 치근면처리에 의해 노출된 상아질면의 교원섬유와 새로 형성된 치주인대 교원섬유간의 연결을 조장하며 PDGF-BB적용시 치주인대섬유아세포의 이주와 증식을 촉진하여 치주인대섬유아세포의 급속한 재군집과 새로운 치주인대의 형성에 기여를 하고 PDGF와 탈회치근면의 기질성분과의 결합으로³⁵⁾ 인하여 탈회된 치근면에 부착된 성장인자의 지속적인 방출을 허용한다고 보고하였다.

그러나 성장인자의 적용시간에 따른 세포증식에 미치는 영향에 관한 연구는 미미하여 상아질의 기질성분과 결합하는 것으로 보고된 성장인자중 섬유아세포의 이주와 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진^{16, 20, 21)} PDGF-BB를 탈회된 상아질면에 적용하였을 경우 PDGF-BB적용시간에 따른 치은섬유아세포의 증식률을 측정, 비교해 보므로써 섬유아세포의 증식에 가장 효과적인 적용시간을 평가하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

배양액은 Dulbecco's modified Eagle

medium(Gibco사, 미국, 이하 DMEM으로 표기)을 사용하였고, fetal bovine serum(Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 치근면탈회제로 테트라사이클린(Sigma사, 미국)을 사용하였고, 유전자 재조합형 혈소판유래성장인자-BB(Genzyme사, 미국, 이하 PDGF-BB로 표기)를 사용하였다.

2. 치은섬유아세포의 배양

초기배양에서 야기될 수 있는 세균감염을 예방하기 위해 통상의 배양액에 포함되는 용량의 2배인 200U/ml penicillin(근화제약, 한국)과 200 μ g/ml streptomycin(동아제약, 한국)이 첨가된 DMEM을 생검배지로 준비하였다. 교정치료를 목적으로 내원한 환자의 발거될 제일소구치를 해당부위로 하여 제일소구치 인접부위의 건강한 치은조직을 절제하여 생검배지에 침수시켰다. 절제된 치은조직을 세절한 다음 100mm배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% FBS와 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 치은섬유아세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층밀생이 형성된 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였으며 본 실험에서는 6, 7세대 치은섬유아세포를 사용하였다.

3. 시편 제작

교정치료를 목적으로 발거한 치아를 carborondum disk를 이용하여 절단하여 상아질 절편을 제작하였고 실험 전에 ethylene oxide gas로 멸균시행하였고, 100mg/ml 농도의 테트라사이클린 수용액에 5분간 시편을

침수시킨 후 인산완충생리식염수로 3회 세척하고 건조시켰다.

4. 증식세포수 측정

50ng/ml PDGF수용액을 준비하고 탈회된 상아질 절편에 대한 적용시간에 따른 치은섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 테트라사이클린으로 처리한 시편을 PDGF-BB수용액에 30초, 1분, 2분, 4분, 8분 동안 침수시킨 후 회수하여 건조시킨 다음 24 well 조직배양접시에 옮기고, 성장인자를 적용하지 않은 시편을 대조군으로 하여, 각 시편에 1 \times 10⁵개의 치은섬유아세포를 포함하는 10% FBS가 함유된 DMEM을 넣은 후 배양하였다. 세포부착이 배양 5분 후부터 시작되어 6시간까지 계속되며 그 후에는 세포분열이 시작된다는 Klebe³⁶⁾의 주장을 근거로 하여 6시간 배양 후 치은섬유아세포가 부착된 각 시편을 새로운 24 well조직배양접시로 이동하고 세포가 포함되지 않은 DMEM을 1ml씩 넣고 24, 48, 72 시간 동안 배양하였다. 각 시간대별로 배양액을 완전히 제거하고 인산완충생리식염수로 세척후 0.05% trypsin/0.02% EDTA로 처리하여 세포를 분리시키고 광학위상차현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 분리된 세포수를 측정한 후 시편의 단위면적당 증식된 세포수를 계산하였다.

III. 성 적

증식세포수의 측정에서 시편단위면적당 세포수를 1 \times 10⁴cells/cm² 단위로 나타내었을 때 24시간에서는 대조군의 1.36 \pm 0.99과 비교시 PDGF-BB 30초 적용군에서 1.37 \pm 0.14, 1분 적용군에서 1.44 \pm 0.15, 2분 적용군에서 1.42 \pm 0.26으로 차이가 없었으나 4분 적용군에서는 2.50 \pm 0.36, 8분 적용군에서는 2.24 \pm 0.25로 세포증식률이 증가한 것을 관찰할 수 있었고,

Table 1. Gingival fibroblast proliferation experiment on dentin surface which were treated with various application time of PDGF-BB (50ng/ml)

	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Tc-P0	1.36±0.09	1.74±0.21	2.26±0.27
Tc-P0.5	1.37±0.14	1.87±0.20	2.50±0.22
Tc-P1	1.44±0.15	2.29±0.14*	3.01±0.40
Tc-P2	1.42±0.26	2.28±0.19*	2.87±0.12*
Tc-P4	2.50±0.36*	3.37±0.32**	3.89±0.16**
Tc-P8	2.24±0.25*	2.58±0.12*	3.19±0.18*

The values were given as mean±S.D.×10⁴ cells/cm².

*significantly different from control value (P<0.05)

**significantly different from control value (P<0.01)

Tc-P0 : Demineralization with Tetracycline only

Tc-P0.5 : Demineralization with Tetracycline+PDGF for 0.5 min.

Tc-P1 : Demineralization with Tetracycline+PDGF for 1 min.

Tc-P2 : Demineralization with Tetracycline+PDGF for 2 min.

Tc-P4 : Demineralization with Tetracycline+PDGF for 4 min.

Tc-P8 : Demineralization with Tetracycline+PDGF for 8 min.

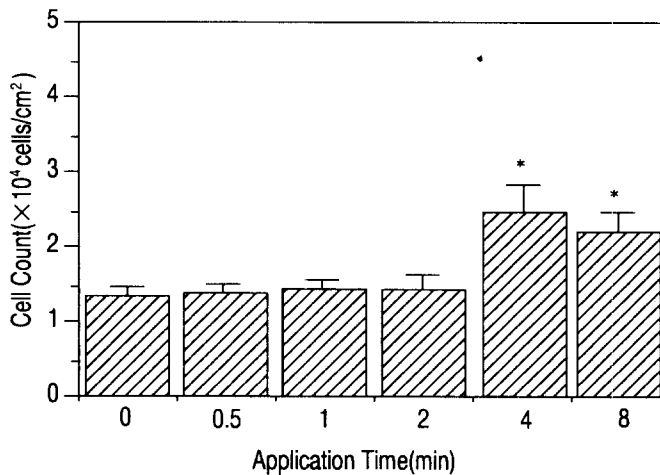


Fig 1. Gingival fibroblast proliferation experiment on dentin surface which were treated with various application time of PDGF-BB (50ng/ml) at 24 hrs

The values were given as mean ± S.D.×10⁴ cells/cm².

*significantly different from control value (P<0.05)

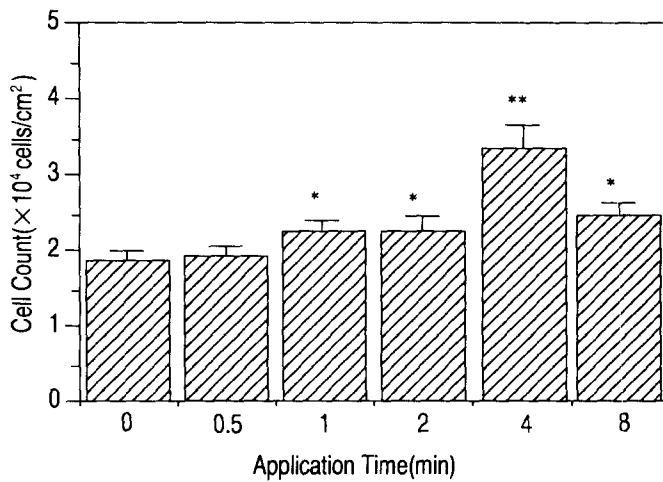


Fig 2. Gingival fibroblast proliferation experiment on dentin surface which were treated with various application time of PDGF-BB (50ng/ml) at 48 hrs

The values were given as mean \pm S.D. $\times 10^4$ cells/cm 2 .

*significantly different from control value (P<0.05)

**significantly different from control value (P<0.01)

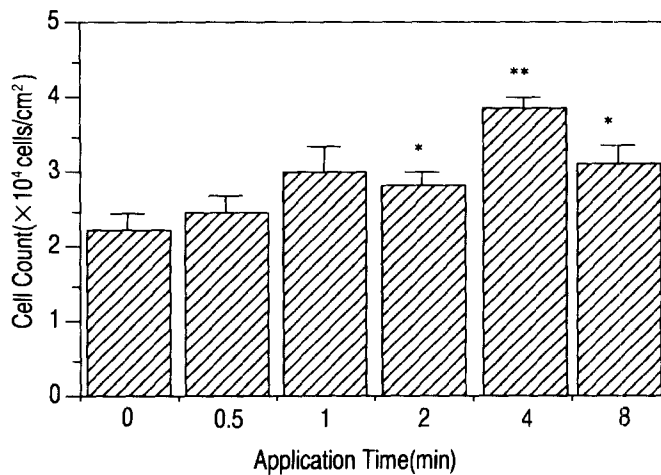


Fig 3. Gingival fibroblast proliferation experiment on dentin surface which were treated with various application time of PDGF-BB(50ng/ml) at 72 hrs

The values were given as mean \pm S.D. $\times 10^4$ cells/cm 2 .

*significantly different from control value (P<0.05)

**significantly different from control value (P<0.01)

대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이 ($P<0.05$)를 보였다(Table 1, Fig 1 참조).

48시간에서는 대조군의 1.74 ± 0.21 과 비교시 30초 적용군에서 1.87 ± 0.20 , 1분 적용군에서는 2.29 ± 0.14 , 2분 적용군에서는 2.28 ± 0.19 , 4분 적용군에서는 3.37 ± 0.32 , 8분 적용군에서는 2.58 ± 0.12 로 세포증식률이 증가하는 양상을 보였으며, 30초 적용군을 제외하고 모든 군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이 ($P<0.05$, $P<0.01$)를 보였다(Table 1, Fig 2 참조).

72시간에서는 대조군의 2.26 ± 0.27 과 비교시 30초 적용군에서는 2.50 ± 0.22 , 1분 적용군에서는 3.01 ± 0.40 , 2분 적용군에서는 2.87 ± 0.12 , 4분 적용군에서는 3.89 ± 0.16 , 8분 적용군에서는 3.19 ± 0.18 로 세포증식률이 증가하는 양상을 관찰할 수 있었고 대조군과 비교시 2, 4, 8분 적용군에서 통계학적으로 유의한 차이 ($P<0.05$, $P<0.01$)를 보였다(Table 1, Fig 3 참조).

PDGF-BB 4분 및 8분 적용군이 본 실험에서 행한 전배양기간에 걸쳐서 대조군과 비교시 세포증식에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며 특히 4분 적용군에서는 타군과 비교시 현저한 세포증식률을 관찰할 수 있었고, 8분 적용군에서는 다른 실험군에서 보다는 높았지만 4분 적용군과 비교시 세포증식률이 낮게 나타났다(Table 1, Fig 1, 2, 3 참조).

IV. 고 찰

치주치료의 이상적인 치유양상은 재생의 형태이며 치주치료는 재생의 치유과정을 유도함으로써 치주조직의 구성성분인 치은, 치주인대, 치조골과 백악질을 질환에 이환되기 전의 원상태로 회복시키는 것을 목적으로 한다.^{1, 2)}

치주조직의 치유부로는 치은상피세포, 치은결체조직세포, 골세포 및 치주인대세포의 4가

지 다른 형태의 세포가 이주해 올 수 있으며 치근면으로 이주해 오는 세포의 표현형에 따라 치유양상이 결정되는데^{3, 7)}, 이들 중 치은섬유아세포는 치은결체조직내에 존재하는 세포의 약 65~85%를 차지하며 방추형 또는 성상형의 형태로 여러 가지 섬유와 결합조직의 기질을 생성하고 유지하여 치주조직의 치유에 관여하고 있으며^{38~40)} 치주인대세포는 섬유아세포, 조골세포, 백악아세포, 미분화중배엽세포들을 함유하고 있어⁴¹⁾ 치주조직의 신부착을 형성하여 치주조직의 재생에 결정적인 기여를 한다고 알려져 있다^{37, 42)}.

치주조직의 재생을 이루기 위해서 여러 가지 치료방법들이 시행되어져 왔는데 Caton 등^{43, 44)}은 변형 위드만 판막술, 냉동자가골수 망상골이식, 골치환물이식, 치근면활택술과 연조직소파술후의 치유양상이 모든 경우에서 긴접합상피의 재형성으로 치유된다고 보고하였으며, 치근면으로 이주해오는 세포의 표현형에 따라 치유양상이 결정된다는 Melcher의 가설³⁷⁾을 근거로 Nyman 등⁶⁾이 치은상피를 배제한 실험모델에서 치유양상이 치주질환에 이환된 치근면에 교원질섬유가 삽입된 신생 백악질이 형성됨을 관찰함으로써 치주조직의 재생에 치주인대세포가 중요한 역할을 할 것이라고 시사한 이래 수많은 학자들의 연구에 의해 조직유도재생술이 치주조직재생을 위한 치료방법으로 사용되게 되었다. 그러나 3급 치근이개부병변같은 큰 결손부위에서는 치주조직재생에 필요한 세포의 치관부로의 이주와 증식이 제한적임으로 인해 그 효과도 제한적이라고 알려져 있다⁴⁵⁾.

최근의 치주조직재생에 대한 연구들중 치주질환에 이환된 치근면상에 새로운 결체조직부착의 형성에 관여하는 인자에 관한 연구들이 관심이 되어져 왔는데³²⁾ 조직재생에서의 필수적인 생물학적 과정중의 하나인 세포에 대한 화학주성은 그 예로서 발육시 외배엽세포의 이주, 신생맥관형성과정에서 내피세포의

이동⁴⁶⁾, 창상치유에서의 섬유아세포의 이동⁴⁷⁾ 등을 들 수 있다. 이러한 화학주성에 관련된 물질로는 fibronectin 등^{32, 33)}이 관여한다고 알려져 있으며 그 외 세포외기질단백질³³⁾, 성장인자들^{15, 16, 20)}이 이러한 성질을 가지는 것으로 알려져 있다.

Terranova 등³⁴⁾은 세포의 화학주성에 있어서 섬유아세포성장인자가 fibronectin보다 만배이상의 능력을 가진다고 보고하였으며 Terranova와 Wikesjo⁷⁾는 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외 기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자에 의해 조절되며 폴리펩타이드계 성장인자가 치주조직재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라고 제시하였다.

조직재생에 관여하는 성장인자로서 PDGF, IGF, TGF, EGF 등이 알려져 있으며 이에 관한 연구가 이루어지고 있다. 이중 PDGF는 약 30kDa의 분자량을 가지는 조절성단백질로서^{9, 10)} 중성구, 단핵세포 그리고 섬유아세포에 대해 화학주성이 있으며^{15, 16)} fibronectin, 교원질분해효소 그리고 다른 성장인자들의 합성을 포함하는 창상치유과정에 있어서 주된 역할을 하는 세포들을 자극시킨다고 알려져 있다^{17, 18)}. PDGF는 단종이량체(PDGF-AA, BB)와 이종이량체(PDGF-AB)로 존재하며¹¹⁾ 세포막에는 두 가지 형태의 PDGF수용기가 있으며 α 형 수용기는 PDGF-AA, AB 그리고 BB에 대해 높은 친화력으로 결합하는 반면 β 형 수용기는 PDGF-BB에 높은 친화력이 있고 PDGF-AB에는 친화력이 낮으며 PDGF-AA는 결합하지 않는다고 알려져 있다⁴⁸⁾. PDGF-BB와 AB는 동등한 활성도를 가지며 사람의 섬유아세포에서 DNA 합성을 자극하는 동일한 강도를 가지고 있으나 PDGF-AA는 세포유사분열에 대한 활성도가 다른 두개의 isoform과 비교시 약하게 나타난다고 알려져 있으며^{49, 50)}, Matsuda 등²⁰⁾은 PDGF-BB가 PDGF-AB보다 낮은 농도에서 세포증식능과

화학주성에 더 큰 영향을 나타낸다고 하였다.

PDGF의 적용농도에 따른 세포증식에 관한 시험관적 연구에서 Canalis⁵¹⁾는 쥐의 두개관을 조직배양하여 0, 1, 10, 100ng/ml의 PDGF-BB투여시 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가함을 보고하였고 Oates 등²¹⁾은 사람의 치주인대세포에 0, 0.1, 1, 5, 10, 20, 50ng/ml의 PDGF-AA, BB를 투여해 본 결과 농도가 증가함에 따라 양군 모두 DNA 합성능이 증가함을 보고하였으며 정 등⁵²⁾은 치주인대세포에 PDGF-BB투여시 세포의 증식을 촉진시키며 20ng/ml일 때 최고의 효과를 보인다고 하였다. Blom 등⁵³⁾은 PDGF가 농도 의존적으로 세포의 활성을 증가시키며 50ng/ml농도에서 DNA 합성이 274%로 나타나고 최적의 유사분열유발농도는 0.1~15ng/ml라고 보고하였는데 생체에서 세포의 이주와 증식에 적절한 PDGF의 농도에 대해서는 아직 알려진 것이 없으나 여러 선학의 연구를 참조시에 주로 50ng/ml이상의 PDGF농도에서 세포의 활성화에 큰 영향을 미치고 이에 따라 세포의 부착과 증식에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 본 실험에서도 50ng/ml의 PDGF농도를 이용하였다.

생체실험에 있어서 성장인자의 적용방법으로 methyl cellulose gel^{24~26)}이나 collagen matrix²⁸⁾같은 매개체와 혼합하여 사용하거나 치근면에 직접 도포^{27, 29)} 또는 탈회된 치근면을 주적용부위로 사용하는 방법^{30, 31)} 등이 시행되어져 왔는데, 운반매체를 이용할 경우 methyl cellulose gel과 혼합사용시 성장인자의 반감기가 3~4.2시간으로, 적용 4일 후에는 96% 이상이 제거된다고 알려져 있으며²⁵⁾ insoluble collagen을 사용시 새로운 치주조직의 재생을 방해하는 이물질로 작용할 수 있는 단점을 가지는 것으로 알려져 있다³⁰⁾.

이에 치근면을 성장인자적용의 주적용부로 이용한 연구에서 다양한 생물학적 거대분자가 상아질상에 흡착될 수 있다고 알려져 있

으며 이러한 상아질상에 흡착된 물질들은 치주기구의 치유와 관련된 세포의 부착과 증식, 이동을 유도하는 것으로 보고되었다³²⁾. 상아질상의 선택적인 세포의 재군집은 상아질-연조직 경계부의 치유에 결정적인 역할을 하므로 특정세포형태의 동원이 결체조직부착의 증진을 야기한다고 알려져 있으며, 치근면의 탈회시 이러한 물질들의 상아질에 대한 결합이 더 증가하여 세포의 이주와 증식을 증가시키는 것으로 밝혀지고 있으며^{33, 34)} Pitaru와 Melcher⁵⁴⁾, Pitaru 등⁵⁵⁾이 시험관적 실험에서 치근면의 탈회시 사람의 치은섬유아세포의 이주, 부착을 촉진시킨다고 보고하였다. 치근면탈회에 사용되는 물질로 테트라사이클린, 구연산 등이 사용되어지고 있는데 테트라사이클린이 구연산보다 더 많은 섬유아세포의 부착을 증진시킨다는 Terranova 등³³⁾의 보고에 따라 본 실험에서도 테트라사이클린을 치근면탈회물질로 이용하였다.

치근면탈회로 인한 성장인자의 결합에 미치는 영향에 관한 연구에서 Terranova 등^{32~34)}은 테트라사이클린으로 상아질면의 처리시 fibronectin의 상아질에 대한 결합이 증가되어 섬유아세포의 부착과 성장을 촉진한다고 하였고 테트라사이클린으로 상아질을 탈회시킨 경우 탈회로 인해 노출된 type I 교원섬유와 염기성 상피세포성장인자의 결합이 비탈회시보다 2.5배 정도 더 증가된다고 보고하였으며 100mg/ml의 테트라사이클린으로 상아질절편을 5분간 처리하였을 때 내피세포성장인자의 결합이 증가한다고 하였다. Cho 등³⁰⁾은 탈회된 치근면에 내배엽성장인자를 적용하였을 때 탈회된 치근면이 내배엽성장인자의 지속적인 방출을 제공한다고 보고하였고 이러한 탈회된 치근면을 성장인자의 주적용부위로 사용시 다른 적용방법과 비교하여 장점으로 치근면처리로 인해 노출된 상아질의 교원섬유와 새로 형성된 치주인대 교원섬유간의 연결을 조장하여 교원섬유의 재부착을 가져오며 치

주인대섬유아세포에 강력한 화학주성과 유사 분열효과를 가지는 PDGF-BB적용시 이들 세포의 이주와 증식을 촉진하여 치주인대섬유아세포의 급속한 재군집과 새로운 치주인대의 형성에 기여한다고 보고하였다. 이상의 연구들을 근거로 하여 본 실험에서는 성장인자가 부착되는 상아질기질성분의 파괴를 막기 위해 Ethylene oxide gas로 멸균시행한 상아질시편을 사용하였고, 테트라사이클린으로 치근면처리시 100mg/ml농도까지 부착세포수가 증가하나 그 이상의 농도에서는 세포수의 감소를 보인다고 한 정과 서⁵⁶⁾의 보고와 100mg/ml농도의 테트라사이클린으로 5분간 처리한 상아질상에 fibronectin, 성장인자의 결합이 가장 높게 나타났다고 한 Terranova 등^{32~34)}의 보고를 근거로 하여 100mg/ml농도의 테트라사이클린으로 5분간 처리한 상아질시편에 50ng/ml농도의 PDGF-BB를 이용하여 임상적용시 유용한 시간으로 사용될 수 있는 시간으로 30초, 1, 2, 4, 8분간 적용한 후 치은섬유아세포를 배양하여 증식세포수를 측정하였다.

세포증식률의 측정에서 테트라사이클린으로만 처리한 대조군과 비교시 탈회 후 PDGF-BB를 적용한 실험군에서 적용시간에 따라 세포증식률이 증가하는 양상이 관찰되었는데 이와 같은 증식률의 증가는 탈회로 인해 노출된 type I 교원섬유에 염기성상피세포성장인자의 결합이 증가한다는 Terranova 등³⁴⁾의 보고와 PDGF가 기질성분과 부착한다는 Kelly 등³⁵⁾의 보고와 같이 섬유아세포에 대해 강력한 화학주성을 나타내는 PDGF-BB가 탈회로 인해 노출된 상아질기질성분에 대해 부착되므로써 치은섬유아세포의 이주와 부착을 증진시켜 높은 증식률을 보인 것으로 사료된다.

PDGF-BB의 적용시간에 따른 세포증식률에서는 48시간에서는 1분 적용군부터, 72시간에서는 2분 적용군부터, 그리고 4분, 8분 적용

군에서는 24, 48, 72시간 공히 대조군과 비교시 증식세포수에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었는데 전반적으로 2분 적용군까지는 세포증식의 정도가 미약하였으며 4, 8분 적용군에서 현저한 증가를 보였고 4분 적용군에서 최대의 섬유아세포증식을 관찰할 수 있었다. 이는 50ng/ml 농도의 PDGF-BB를 탈회된 치근면에 적용시 섬유아세포의 부착과 증식에 영향을 줄 수 있는 PDGF-BB와 상아질의 기질성분과의 부착은 최소 1분 이상의 적용시간에서부터 미약하게 나타나기 시작하며 4분 이상의 적용시간이 효과적인 치은섬유아세포의 증식에 영향을 미칠수 있는 교원섬유와 PDGF-BB의 적절한 부착을 허용하는 시간으로 작용한 것으로 사료된다. 이상의 결과로써 50ng/ml 농도의 PDGF-BB를 탈회된 치근면에 적용시 섬유아세포의 높은 증식률을 이루기 위한 적용시간은 4분이 PDGF-BB와 상아질기질성분과의 효과적인 부착을 이루는데 있어서 적절한 시간인 것으로 사료되고 4분 적용군에 비해 8분 적용군에서 24, 48, 72시간 공히 증식세포수가 감소한 양상을 보였는데 이에 대해서는 향후 장기간의 적용시간에 따른 상아질기질성분과 성장인자의 결합정도에 대한 평가와 이러한 성장인자의 결합으로 인해 섬유아세포의 부착과 증식에 영향을 미칠 수 있는 상아질기질성분의 변화가능성에 대해서도 부가적인 연구가 더 필요할 것으로 사료되며, 그리고 타 성장인자가 탈회된 치근면에서 미치는 영향등에 대해서도 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 요약

섬유아세포의 이주와 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 PDGF-BB를 이용하여 테트라사이클린으로 탈회시킨 치근면에 PDGF-BB의 다양한 적용시간에 따른 증식세

포수를 측정해 봄으로써 PDGF적용시간이 섬유아세포의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

교정치료를 목적으로 내원한 환자의 발거한 소구치를 이용하여 상아질절편을 제작하여 시편으로 사용하였다. 100mg/ml 농도의 테트라사이클린으로 5분간 탈회시킨 시편을 50ng/ml 농도의 PDGF-BB로 30초, 1분, 2분, 4분, 8분 동안 처리하고 성장인자를 적용하지 않은 시편을 대조군으로 하여 각 시편을 24well 조직배양접시에 넣고 1×10^5 개의 치은 섬유아세포를 가진 배양액 1ml 씩을 넣어 6시간 배양한 후 새로운 배양접시로 옮기고 24, 48, 72시간동안 배양하여 각 시간대별로 0.05% trypsin/0.02% EDTA로 처리하고 세포를 분리하여 광학위상차현미경하에서 세포수를 측정하고 시편의 단위면적당 세포수를 계산하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

세포증식률의 측정실험에서 24, 48, 72시간 공히 대조군과 비교시 PDGF-BB 적용시간의 증가에 따라 증식세포수가 증가하였으며 4분 및 8분 적용군에서 세포증식률의 현저한 증가양상을 보였다.

PDGF-BB적용군과 테트라사이클린만 처리한 대조군과 비교시 24, 48시간에서는 PDGF-BB 1분 적용군부터 세포수 증가를 관찰할 수 있었으나 적용시간 2분까지는 그 정도가 미약하였으며 4, 8분 적용군에서 24, 48, 72시간 모두에서 대조군과 비교시 세포수 증가가 현저한 것을 관찰할 수 있었다.

PDGF-BB 적용군사이에서는 4분 적용군이 세포증식률이 가장 높은 것으로 나타났고, 8분 적용군에서는 4분 적용군에 비해 24, 48, 72시간 모두에서 세포증식률이 감소하는 경향을 보였다.

이상의 연구를 미루어 볼 때 치은섬유아세포의 증식률에서 PDGF-BB 4분 적용군이 24, 48, 72시간 모두에서 타군과 비교시 현저한 증가를 보였으므로 탈회된 상아질을 PDGF-

BB의 주적용부로 하였을때 50ng/ml농도의 PDGF-BB사용시 4분정도의 적용시간이 섬유아세포의 증식을 이루는데 있어서 가장 적절한 시간이 될 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 서조영 외 17인 : 치주과학, 2판, 지영문화사, 1992, p.473-476.
2. Lindhe, J. : Textbook of Clinical Periodontology, 2nd ed., Munksguard Co., Copenhagen, 1989, p.450.
3. Listgarten, M.A. and Rosenberg, M.M. : Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions, J. Periodontol., 50 : 333-344, 1979.
4. Gould, T.R.L., Melcher, A.H., and Brunette, D.M. : Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding, J. Periodont. Res., 15 : 20-42, 1980.
5. McCulloch, C.A.G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice, Anat. Rec., 211 : 258-262, 1985.
6. 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.
7. Terranova, V.P. and Wikesjo, U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factor as mediators of functions of cell of the periodontium, J. Periodontol., 58 : 371-380, 1987.
8. Graves, D.T. and Cochran, D.L. : Mesenchymal cell growth factors, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1 : 17-36, 1990.
9. 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.
10. Deuel, T.F., Huang, J.S., Proffit, R.I., 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.
11. Hammacher, A., Hellman, U., and Johnsson, A. : A major part of PDGF purified from human platelet is a heterodimer of one A and one B chain, J. Biol. Chem., 263 : 16493-16498, 1988.
12. Hawiger, J. : Platelet secretory pathway : An overview, Method, Enzyme, 169 : 191-195, 1989.
13. Antoniades, H.N. and Owen, A.J. : Growth factors and regulation of cell growth, Annu. Rev. Med., 33 : 445-463, 1982.
14. Kohler, N. and Lipton, A. : Platelets as a source of fibroblast growth promoting activity, Exp. Cell Res., 87 : 297-301, 1974.
15. Deuel, T.F., Senior, R.M., Huang, J.S., and Griffin, G.L. : Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor, J. Clin. Invest., 69 : 1046-1049, 1982.
16. Senior, R.M., Griffi, G.L. Hwang, J.S. Walz, D.A., and Deuel, T.F. : Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts, J. Cell Biol., 96 : 382-385, 1983.
17. Tzeng, D.Y., Deuel, T.F., Hwang, J.S., and Baehner, R.L. : Platelet-derived

- growth factor promotes human peripheral monocyte activation, *Blood*, 66 : 179-183, 1985.
18. Bauer, E.A., Cooper, T.W., Hwang, J.S., Altman, J., and Deuel, T.F. : Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 : 4132-4136, 1985.
 19. Rutherford, R.B., Trilsmith, M.D., Ryan, H.E., and Charette, M.F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factors mitogenesis in vitro, *Archs Oral Biol.*, 37 : 139- 145, 1992.
 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. 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.
 22. Lynch, S.E., Nixon, J.C., Colvin, R.V., and Antoniades, H.N. : Role of platelet-derived growth factor in wound healing : Synergistic effects with other growth factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84 : 7696-7700, 1987.
 23. 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.
 24. Lynch, S.E., Williams, R.C., Polson, A. M., Howell, T.H., Zappa, U.E., and Antoniades, H.N. : A combination of platelet-derived & insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration, *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 545-548, 1989.
 25. Lynch, S.E., Castilla, G.R., William, R.C., Kiritsy, C.P., Howell, T.H., and Reddy, M.S. : The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing, *J. Periodontol.*, 62 : 458-467, 1991.
 26. Rutherford, R.B., Niekrash, C.E., Kennedy, J.E., and Charette, M.F. : Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys, *J. Periodont. Res.*, 27 : 285-290, 1992.
 27. 조무현, 박준봉 : 혈소판유래성장인자-BB가 성견 치근이개부병변의 조직재생에 미치는 효과, *대한치주과학회지*, 23권 : 535-563, 1993.
 28. Rutherford, R.B., Ryan M.E., Kennedy J.E., Tucker M.M., and Charette, M.F. : Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induced regeneration of the periodontium in monkeys, *J. Clin. Periodontol.*, 20 : 537-544, 1993.
 29. Wang, H.L., Pappert, T.D., and Castelli, W.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.
 30. Cho, M.I., Lin W.L., and Genco, R.J. : Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy, *J. Periodontol.*, 66 : 522-530, 1995.

31. 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.
32. Terranova, V.P., Hic, S., Franzetti, L., Lyall, R.M., and Wikesjo, U.M.E. : A biochemical approach to periodontal regeneration, *AFSCM : Assay for specific cell migration*, *J. Periodontol.*, 58 : 247, 1987.
33. Terranova, V.P., Franzetti, L.C., and Hic, S. : A biochemical approach to periodontal regeneration : Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth, *J. Periodont. Res.*, 21 : 330, 1986.
34. Terranova, V.P., Odziemiec C., Katherine, S.T., and Spadone, D.P. : Repopulation of dentin surface by periodontal ligament cells and endothelial cells : Effect of basic fibroblast growth factor, *J. Periodontol.*, 60 : 293-301, 1989.
35. Kelly, J.U., Sanchez, A., Brown, G.S., Chesterman, C.N., and Sleigh, M.J. : Accumulation of PDGF B and gen-binding forms of PDGF A in the extracellular matrix, *J. Cell Biology*, 121 : 1153-1163, 1993.
36. Klebe, R.J. : Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor, *Nature*, 250 : 248-251, 1974.
37. Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissue, *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
38. Lindhe J. : *Textbook of Clinical Periodontology*, 2nd ed., Munksguard Co., Copenhagen, 1989, p.37.
39. Carranza F.A. : *Glickman's clinical periodontology*, 7th ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia , 1990, p.28.
40. Mariotti A. and Cochran D. L. : Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva, *J. Periodontol.*, 61: 103-111, 1990.
41. Beertsen, W., Everts, V., and Van der Hooff A. : Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption, *Archs. Oral Biol.*, 19 : 1087-1098, 1974.
42. 서조영외 17인 : *치주과학*, 2판, 지영문회사, 1992, p.28-57.
43. Caton, J. and Nyman, S. : Histometric evaluation of periodontal surgery. I. The modified Widman flap procedure, *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 212-223, 1980.
44. Caton, J., Nyman, S., and Zander, H. : Histometric evaluation of periodontal surgery.II.Connective tissue attachment after four regenerative procedures, *J. Clin. Periodontol.*, 7: 224-231, 1980.
45. Pontoriero, R., Lindhe, J., Nyman, S., and Karring, T. : Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defect in mandibular molars : A clinical study of degree III involvement, *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 170-174, 1989.
46. Terranova, V.P., DiFlorio, R., and Lyall, R.M. : Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin, *J. Cell. Biol.*, 101 :

2330, 1985.

47. Gans-Muller, A. and Kleinman, H.K. : Role of attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis, *J. Lab. Clin. Med.*, 96 : 1071, 1980.
48. Williams, L.T. : Signal transduction by platelet-derived growth factor receptor, *Science*, 243 : 1564-1570, 1987.
49. Nister, M., Hammacher, A., and Mellstrom, K. : A glioma-derived platelet-derived growth factor : a chain homodimer has different functional activities than a PDGF-AB heterodimer from platelet, *Cell*, 52 : 791-803, 1988.
50. Kazlauskas, A., Bowen-Pope, D., Seifert, R., Hant, C.E., and Cooper, J.A. : Different effect of homo- and heterodimers of PDGF and chains on human and mouse fibroblasts, *EMBO. J.*, 7 : 3727-3731, 1988.
51. Canalis, E. : Effect of PDGF on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, *Metabolism*, 30 : 970-975, 1981.
52. 정성민, 이만섭, 권영혁, 조종만 : 혈소판유래성장인자가 치주인대의 증식에

미치는 효과에 관한 연구, *대한치주과학회지*, 22권 : 317-330, 1992.

53. Blom, S., Holmstrup, P., and Dabelsteen, E. : A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cell's DNA synthesis and morphology, *J. Periodontol.*, 65 : 373-378, 1994.
54. Pitaru, S. and Melcher, A.H. : Orientation of gingiva fibroblasts and newly-synthesized collagen fibers in vitro, *J. Perio. Research*, 18 : 483-500, 1983.
55. Pitaru, S., Gray, A., Aubin, J.E., and Melcher, A.H. : The influence of the morphological and chemical nature of dental surface on the migration, attachment and orientation of human gingival fibroblasts in vitro, *J. Perio. Research*, 19 : 408-418, 1984.
56. 정오철, 서조영 : 치근면에 도포한 테트라사이클린이 치주인대의 증식과 전개에 미치는 영향, *경북치대논문집*, 11권, 1994.

The Influence of PDGF-BB Application Time on the Proliferation of HGF Using Decalcified Dentin

Jin-Woo Park, Jae-Mok Lee, Jo-Young Sun

Department of periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University
Taegu, Korea

Platelet-derived growth factor(PDGF) is one of the polypeptide growth factors. PDGF has been reported as a biological mediator which regulates activities of wound healing process including the cell proliferation, migration and metabolism. Recent studies indicated that demineralized root surface as the primary site for growth factor application has advantages over other application method, especially due to binding capacity of growth factor for exposed matrix component of demineralized dentin surface.

The purpose of this study is to evaluate optimal application time of PDGF-BB on proliferation of human gingival fibroblasts using demineralized dentin surface as primary application site.

Human gingival fibroblasts and dentin slabs were prepared from the first premolar tooth extracted for the orthodontic treatment, cells were cultured in DMEM/10% FBS at the 37°C, 5% CO₂ incubator. All of the dentin slabs were preconditioned with Tetracycline HCl(100mg/ml) solution and rinsed in PBS. In the cell proliferation experiment, experimental group was immersed in DMEM containing 10% FBS, 50ng/ml PDGF-BB during different time(30sec, 1, 2, 4, 8 minutes) and dried.

Cells at concentration of 1×10^5 cells/ml were seeded in each culture well which contained dentin slabs and incubated for 6 hours. Then, all of the dentin slabs were moved into new 24 well culture dish and incubated for 24, 48, 72 hours. The cell counting was done by hemocytometer with inverted phase contrast microscope after trypsinization.

The results were as follows :

The application of PDGF-BB for 1, 2 min slightly increased the number of gingival fibroblasts, and the application of PDGF-BB for 4, 8 min prominently increased the number of gingival fibroblasts. The application of PDGF-BB for 4 min showed maximum proliferation rate of gingival fibroblasts at 24, 48, 72 hours, and the application of PDGF-BB for 8 min showed less proliferation rate of gingival fibroblasts compared to the application of PDGF-BB for 4 min at 24, 48, 72 hours.

In conclusion, the application of PDGF-BB for 4 min appeared to be optimal to obtain maximum proliferation of gingival fibroblasts using demineralized dentin surface as primary applicaton site of PDGF-BB.