

## 산소 장력이 치주인대에서 유래한 세포의 활성과 기능에 미치는 영향

사 명 회<sup>1)</sup> · 양 원 식<sup>2)</sup>

본 연구는 산소 장력이 사람의 치주인대에서 유래된 세포의 활성화와 세포의 기질 및 cytokine에 미치는 영향을 알아보고자 저산소 및 과산소 조건에서 배양한 후 세포의 활성화, 총 단백질 합성, 교원질 합성, 그리고 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 측정하였다.

교정치료를 위해 발거한 제 1 소구치에서 사람의 치주인대 세포를 채취하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도의 환경에서 배양한 후 5 내지 6 계대배양하여 실험에 사용하였다. Gaspack system에 0.2 $\mu$ m Millipore filter를 부착하여 세균 감염을 막았고, 저산소군에는 10% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub> 가스를, 과산소군에는 90% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% N<sub>2</sub> 가스를 연결하여 산소 장력에 변화를 주었으며 대조군에는 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기를 공급하였다. 37°C에서 2, 4, 6일간 배양한 후에 세포 활성을 측정하기 위해 tetrazolium(MTT) assay를 시행하였고 sulforhodamine B(SRB) assay를 이용하여 총 단백질 합성을 알아보았으며, 4-hydroxyproline 측정으로 교원질 합성을 측정해 보았다. 또한 효소면역측정법으로 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 저산소군에서 세포 활성화와 총 단백질 합성은 대조군보다 다소 높거나 같은 정도이었다.
2. 과산소군에서 세포 활성화는 대조군보다 낮았으며 총 단백질 합성도 다소 감소되었다.
3. 교원질 합성은 저산소군과 과산소군에서 대조군보다 유의하게 감소되었다가 배양기간이 길어짐에 따라 증가되어 대조군과 유사한 정도에 달했다.
4. 효소면역법 측정 결과 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  순으로 다량 검출되었다.
5. IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 저산소군과 과산소군에서 배양기간이 길어짐에 따라 대조군에 비해 급격히 증가하였다.
6. IL-6, TNF- $\alpha$ 는 과산소 조건에서 배양 6일 후에는 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며 이는 배양 2일 또는 4일 후보다도 유의하게 증가한 것이었다.

( 주요단어 : 산소 장력, 세포의 기질, Interleukin-6, Tumor necrosis factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ )

### I. 서 론

교정의는 치주조직이 치아에 가한 교정력을 어떤 과정을 통해 인지하며 치아가 새로운 위치로 이동되는지에 대하여 바르게 이해하고 있어야 한다. 치아가 이동할 때 주위조직에서 일어나는 현상에 관해서는

조직학적 관찰을 비롯하여 다양한 방법을 통한 다수의 연구들<sup>4-6)8-15)18)51-55)</sup>로부터 얻은 지식에 의해 많은 것이 밝혀졌으나 아직도 상당 부분이 규명해야 할 과제로 남아있다.

치아를 지지하고 있는 치주조직 중 치주인대는 백악질과 치조골을 연결하는 다량의 세포와 혈관으로 이루어진 결합조직으로서 매우 풍부한 혈액 공급을 받고 있으므로 치주인대의 혈류 변화는 치주조직 변화와 골 개조에 밀접한 관련이 있다<sup>32,33)</sup>. 치주인대를

<sup>1)</sup> 서울대학교 치과대학 치과교정학교실

<sup>2)</sup> 서울대학교 치과대학 치과교정학교실, 교수

구성하는 주된 세포 형태는 섬유아세포이며 혈관 주위로 소수의 미분화된 섬유아세포가 존재한다. 백서의 교정적 치아 이동에서 새로 분화된 섬유아세포의 일부는 치조골 표면을 향해 이동하여 골아세포로 분화하며 교정력에 의해 발생된 골아세포는 주로 인접 치주인대내의 섬유아세포에서 분화된<sup>49,50</sup>고 한다. 최근의 연구들에 의하면 치주인대 섬유아세포는 골아세포와 같은 특성을 갖는다<sup>40</sup>. 즉, 치주인대 섬유아세포는 골아세포와 유사한 수준의 alkaline phosphatase 활성을 보이며<sup>64</sup> 부갑상선 호르몬과 비타민 D에 의해 cAMP와 cBGP(bone  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein) 같은 단백질 생산이 증가된다<sup>46</sup>. 또한 치아 이동시 혈관 주위의 섬유아세포는 치주인대 섬유아세포뿐 아니라 골아세포로도 분화한다<sup>50</sup>.

교정력이 가해졌을 때 치주조직에서 가장 먼저 일어나는 변화중 하나가 치주인대내 혈관의 변화<sup>44</sup>로 알려져 있다. 견인측에서는 혈관이 확장되며<sup>16)19)27)38, 39)41)51</sup> 압박측에서는 혈관이 압축되어 주행 변화가 관찰되고<sup>1)17)21) 53,54</sup> 일정한 크기 이상의 힘이 가해지면 빈혈대가 형성되어<sup>52</sup> 불가역성 혈전이 생긴다고 보고되었다. 치주조직 같은 복잡한 구조를 가진 조직에 혈류의 변화가 생기면 국소적으로 산소 장력(oxygen tension)에도 변화가 올 것으로 생각되며 이는 조직내 세포 대사에도 많은 영향을 미칠 것이다. 세포의 미세환경에 일어난 변화가 세포에 미치는 영향은 그 세포가 산소를 필요로 하는 정도와 변화된 주위 산소 조건에 적응할 수 있는 정도에 따라 차이가 있을 것으로 보인다<sup>63</sup>.

Kubota<sup>37</sup>는 교정력을 부여했을 때 압박측 치주인대는 혈류 감소에 따른 저산소 상태에 놓이고 이것이 자극이 되어 세포로부터 프로스타글란딘 등의 화학적 전달 물질이 생산되어서 골 세포에 작용하여 골 흡수를 일으킬 것이라고 하였다.

Tuncay 등<sup>62</sup>도 산소 장력이 골아세포의 대사적 기능적 활성을 조절한다는 실험 결과를 보고하였으며 교정력 부여로 생긴 혈류의 변화는 주위조직내 산소 환경의 변화를 가져오고 이것이 골개조를 일으키는 강력한 자극으로 작용할 것으로 보았다.

세포의 기질 단백질(extracellular matrix protein)은 교원질, 당단백질, proteoglycan, elastin으로 분류되며 서로 구조적, 기능적으로 밀접하게 연결되어 장기 및 조직의 골격과 형태를 유지시킨다. 특히 교원질은 인체에서 가장 많이 존재하는 단백질로 섬유아세포, 골아세포, 내피세포, 상피세포 등이 생산하며 치

주인대를 구성하는 단백질의 대부분을 차지한다. 최근에는 세포의 기질이 세포의 형 구성(pattern formation)이나 세포간 정보 전달에 중요한 역할을 하는 것<sup>58</sup>으로 주목받고 있다. 세포는 환경 변화등의 외부 자극이 가해졌을 때 생성하는 세포외 기질의 변화를 보이며 산소 장력은 세포 분화에도 영향을 미친다<sup>25</sup>고 알려져있다.

Yen 등<sup>65</sup>은 산소 분압이 치주조직의 단백질 합성과 교원질의 hydroxylation에 미치는 영향을 보고한 바 있다. Stern 등<sup>60</sup>은 산소 장력을 다르게 주고 골의 교원질 합성과 분해를 측정하여 낮은 산소 장력에서는 교원질 합성이 주로 일어나며 산소 장력이 증가하면 합성의 증가와 더불어 분해도 증가된다고 하였다.

교정적 치아 이동시 주위 조직은 급성 염증반응을 보이며 창상이나 골절 치유의 면역 반응과 많은 공통점을 갖는다. cytokine은 면역계 세포들이 분비하는 단백질로 염증 반응과 면역 조절 기능을 가지고 있으며<sup>24)57</sup> 결합 조직의 개조에 상당한 영향을 미칠 뿐 아니라 골 개조에도 관여함이 알려지면서 교정적 치아 이동시 어떤 역할을 하는지 관심이 높아지고 있다. 즉 cytokine은 교정력이 어떤 물질을 매개로 골의 흡수 및 형성을 유도하고 치아 이동을 일으키는데 깊이 관여하고 있다<sup>20)56,57</sup>는 연구 결과가 보고되고 있으며, 일부 cytokine은 치아 이동시 주위 조직에서 형성되는 것이 면역조직학적으로 확인되었다<sup>24</sup>. 특히 치주인대나 골조직에 외력이 가해질 때 면역계 세포들이 방출하게 되는 여러 종류의 cytokine 중에서도 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등은 골 흡수 과정에 깊이 관여하는 것<sup>7</sup>으로 알려져 있다.

본 연구는 사람의 치주인대에서 유래된 세포를 상반된 산소 조건 하에서 배양한 후 세포의 증식과 성장을 측정하고 총 단백질 합성 및 교원질 합성 그리고 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 측정 비교하여 산소 장력이 세포 활성과 세포외 기질 및 cytokine에 미치는 영향을 알아보려고 시행하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 치주인대 유래 세포의 채집 및 배양

Ragnarsson 등<sup>48</sup>의 치주인대 섬유아세포의 배양 방법에 준하여 시행하였다. 교정 치료를 위하여 탈거한 제 1 소구치에서 치은 부착부는 날카로운 큐렛으

로 제거하였다. 치관부를 5.25% sodium hydrochloride 용액에 2분간 담가서 박테리아 및 잔존 상피 세포를 제거한 다음 치아를 100U/ml의 penicilline 및 100µg/ml의 streptomycin (Gibco, Grand Island, N.Y., U.S.A.)이 첨가된  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM)(Gibco, Grand Island, N.Y., USA) 생검배지에 침수시켰다. 이 치아를 생검배지로 5회 세척후 치근 중간 1/3 부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절한 다음 60mm의 세포 배양 접시에 고르게 분산시키고 2ml의 배양액을 주입하여 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 배양기(Shel-lab., U.S.A.)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% fetal bovine serum(FBS), 100U/ml의 penicilline 및 100µg/ml의 streptomycin 혼합제가 포함된  $\alpha$ -MEM을 사용하였고, 밀생할 때까지 3일간격으로 교환해 주었다. 본 실험에서는 5 내지 6 세대 계대배양한 세포들을 사용하였다.

### 산소 장력의 형성

Gaspack system(Bectin Dickinson Diagnostic instrument systems, Cockeysville, MD, U.S.A.)을 고무관으로 가스통과 연결시키고 고무관에서 Gaspack system으로 연결되는 부위에 0.2µm의 Millipore filter를 사용하여 세균감염을 방지하였다. Gaspack system 뚜껑의 마개를 먼저 연 상태에서 가스통의 코크를 열어 Gaspack system 내부가 연결시킨 가스로 교환되게 하고 phenol red가 첨가된 배양액을 넣어 진분홍색에서 연분홍색으로 바뀌는 것으로 가스가 교환됨을 확인하였다. 60mm 배양 접시에 치주인대 유래 세포를  $1 \times 10^4$  cell/dish로 넣고 배양액 3ml을 주입한 후 Gaspack system에 넣었다.

저산소균은 10% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>의 가스 조건, 과산소균은 90% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% N<sub>2</sub>의 가스 조건에서 배양하였고 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기에서 배양한 치주인대 유래 세포를 대조군으로 사용하였다.

각 군은 37°C에서 2, 4, 6일간 배양한 후 다음과 같은 측정법을 행했다.

### 세포 활성의 측정

살아있는 세포의 미토콘드리아 dehydrogenase에 의해 3-(4,5-dimethyl thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)가 spectrometor로 측정 가능한 blue formazan product로 cellular reduction됨

에 근거한<sup>43)66)</sup> MTT 검색법을 이용하였다.

각 실험 조건에서 세포를 배양한 후 생리적 식염수에 용해한 MTT 용액 (최종농도 5mg/ml) (Sigma Co., MO., U.S.A.)을 각 well에 20µl씩 넣고 37°C에서 4시간동안 반응시킨 후 MTT 용액을 제거하였다. 형성된 formazan crystal을 용해시키기 위해 dimethyl sulphoxide(DMSO)를 50µl씩 첨가하고 plate를 잘 흔든 후 ELISA reader (Tokyo chemical Co, Tokyo, Japan)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{세포활성도(\%)} = \frac{\text{실험 well의 흡광도}}{\text{대조 well의 흡광도}} \times 100$$

### 총 단백질 합성 측정

sulforhodamine B(SRB) 검색법은 세포가 합성한 총 단백질을 측정하는 방법으로 sulforhodamine B(SRB)는 세포를 밝은 분홍색으로 염색시킨다<sup>35)</sup>.

각 실험 조건에서 배양한 세포에 50% cold trichloroacetic acid(TCA)를 50µl/well씩 가하여 최종 농도 10%에 달하게 하여 4°C에서 1시간동안 방치하여 단백질 침전에 의해 세포를 고정하였다. 증류수로 5회 세척하고 나서 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB 용액 50µl/well을 가하여 상온에서 30분간 염색한 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 결합하지 않은 염색물을 제거하였다. 세포를 잘 건조시킨후 10mM/l unbuffered tris(hydroxy) aminomethane(Tris base) 150µl로 SRB-bound protein을 잘 용해시키고 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4-hydroxyproline 측정

교원질 합성을 측정하기 위해 Jamall 등<sup>34)</sup>의 방법을 약간 개선하여 시행하였으며 사용된 시약은 다음과 같이 조제하였다.

acetate-citrate buffer (pH 6.0): 3.75g의 trisodium citrate과 5.5g의 citric acid monohydrate를 395ml의 isopropyl alcohol에 용해시킨 후 증류수를 가하여 최종적으로 1000ml을 만들었다.

chloramine-T 용액: 672mg의 chloramine-T를 10ml acetate-citrate buffer에 용해시켰다.

Ehrlich's reagent solution: 10g의  $\rho$ -dimethylaminobenzaldehyde를 11ml의 60% perchloric acid에

**Table I.** Effect of oxygen tension on the cellular activity in the cells derived from periodontal ligament (%)

	2 day	4 day	6 day
control	100.05±2.29	100.00± 3.23	100.04±8.78
10% O <sub>2</sub>	111.49±8.40	99.62± 2.52	105.70±4.02*
90% O <sub>2</sub>	80.40±6.09	67.21±19.31	64.83±1.90

\*Statistically significant(10% vs 90%) (P<0.05)

**Table II.** Effect of oxygen tension on the production of total protein in the cells derived from periodontal ligament (%)

	2 day	4 day	6 day
control	100.00±0.05	100.00±0.06	100.00±0.00
10% O <sub>2</sub>	104.44±1.10	99.98±0.34	102.06±0.07
90% O <sub>2</sub>	98.91±0.94	76.80±8.57	91.11±1.66

**Table III.** Effect of oxygen tension on the production of 4-hydroxyproline in the cells derived from periodontal ligament (μg/ml)

	2 day	4 day	6 day
control	9.33±1.49	9.21±0.37	6.28±0.53****
10% O <sub>2</sub>	5.32±0.51*	8.62±0.83***	6.73±0.83
90% O <sub>2</sub>	5.82±0.94**	7.58±0.51	5.40±0.52

\* Statistically significant(control vs 10%) (P<0.001)

\*\* Statistically significant(control vs 90%) (P<0.05)

\*\*\*Statistically significant(2 day vs 4 day) (P<0.05)

\*\*\*\*Statistically significant(4 day vs 6 day) (P<0.05)

용해시켜 stock solution을 만들었다. stock solution 3ml에 50% isopropyl alcohol 8ml을 혼합하여 사용하였다.

각 실험 조건에서 세포를 배양한 후 2ml 6N HCl에 넣고 110°C에서 12시간 가수분해시켜 30분간 실온에서 방치한 후 여과하여 50μl씩을 취했다. 완전히 건조시킨 다음 methanol 50μl를 가하고 남아있는 염산이 제거될 때까지 110°C에서 반응시켰다. 50% isopropyl

alcohol 1.2ml을 넣어 남은 침전물을 용해하고, 200μl의 chloramine-T를 첨가하여 상온에서 10분간 방치하였다. 1.0ml Ehrlich's reagent solution을 가하여 혼합하고 50°C에서 90분간 배양한 후 상온에서 식혀 ELISA reader를 이용하여 558nm 에서 흡광도를 측정하였다.

4-hydroxyproline의 표준용액을 만들기 위해 1mg의 trans 4-hydroxyproline(Sigma Co., St.Louis, MO, U.S.A.)을 1ml 6N-HCl에 녹여 stock solution을 만들고 0, 8, 16, 24, 32, 40 μg/ml 6N-HCl이 되게 희석한 후 110°C에서 12시간 가수분해하였다.

각 시료에 함유된 4-hydroxyproline의 양은 다음의 식으로 구했다.

$$\frac{B \times 2000ml \times 1.0g}{\frac{A}{C} \times D} = 4\text{-hydroxyproline } \mu\text{g/ml}$$

A: 558nm에서 표준검체 1.0g의 흡광도치  
 B: 시료의 흡광도치  
 C: 시료의 volume  
 D: 시료 무게

IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 효소면역측정

Genzyme (Cambridge, MA., USA)사의 Predica enzymeimmunoassay system kit를 사용하였으며 제조사의 지시에 따라 다음과 같이 측정하였다.

monoclonal anti-human IL-1β (또는 IL-6나 TNF-α)가 부착된 microtiter plate에 100μl의 표준검체 및 각 군의 배양상층액을 넣고 plate sealer로 덮어서 37°C에서 30분간 반응시켰다. test well의 내용물을 덜어내고 wash buffer로 철저히 5회 세척하고 제거한다. 각 well에 IL-1β (또는 IL-6나 TNF-α) 항체를 100μl 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 5회 세척한 후 희석한 IL-1β (또는 IL-6나 TNF-α) reagent를 100μl씩 가하고 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 5회 세척하였다. 100μl의 working substrate reagent를 가하고 상온 (18-24°C)에서 10내지 30분간 배양한 후 50μl의 stop solution을 첨가한 후 30분 이내에 450nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 표준 그래프에서 중량으로 환산하였다.

통계 처리

각 실험치는 ANOVA를 이용하여 분석하였고

Mean ± SEM(standard error of mean)으로 나타내었다.

### III. 연구결과

저산소군의 세포활성은 대조군과 거의 같거나 다소 높게 나타났으며 배양기간이 길어짐에 따라서도 큰 변동을 나타내지 않았다. 과산소군은 대조군보다 세포활성이 낮았으며 4일 후부터 더욱 감소되어 6일 후에는 저산소군과 과산소군간 세포활성에 유의한 차이가 있었다(P<0.05)(Table I, Fig. 1).

총단백질, 합성에서 저산소군은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으며 배양기간이 길어져도 큰 변화가 없었다. 과산소군은 배양 2일 후에 대조군과 같은 정도이었다가 4일 후에는 감소하였고 6일 후에 다시 증가하였으나 대조군에 못 미쳤다(Table II, Fig. 2).

교원질의 합성은 대조군에서 두 실험군보다 많은 것으로 나타났으나 배양기간이 길어지면서 감소되어 6일 후에는 4일에 비해 유의하게 감소되는 양상을 보였다. 한편 저산소군과 과산소군에서는 배양 2일 후에 대조군보다 유의하게 감소되어 있었으나 4일 후에는 증가되었으며 특히 저산소군에서는 2일에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 배양 6일 후에는 교원질 합성이 두 실험군 모두에서 감소되었으나 대조군과 큰 차이가 없었다(Table III, Fig. 3).

IL-1β, IL-6, TNF-α는 효소면역법으로 측정된 결과 양에 있어서 IL-6, TNF-α, IL-1β 순으로 나타났다(Table IV-VI, Fig. 4-6).

IL-6는 저산소군과 과산소군에서 배양기간이 길어질수록 증가되는 경향을 보였으며 과산소 조건에서 6일간 배양했을 때 대조군보다 유의하게 (P<0.001) 증가되었고 이는 2일 후(P<0.001)나 4일 후(P<0.05)와도 유의한 차이를 보였다(Table IV, Fig. 4).

TNF-α도 저산소군과 과산소군에서 배양기간이 길어질수록 대조군에 비해 증가되었으며 대조군에서는 2일에서 4일동안 증가된 반면 두 실험군에서는 4일과 6일 사이에 급격히 증가되는 형태를 나타내었다. 특히 과산소 조건에서 6일간 배양했을 때 IL-6와 마찬가지로 대조군보다 유의하게(P<0.001) 증가되었고 이는 2일 후(P<0.001)나 4일 후(P<0.05)와도 유의한 차이가 있었다(Table V, Fig. 5).

IL-1β는 IL-6나 TNF-α보다는 적은 양이 측정되었으나 역시 배양 일수가 길어짐에 따라 증가되는 양상을 띄었다. 또한 과산소 조건에서는 6일간 배양했을

**Table IV.** Effect of oxygen tension on the production of IL-6 in the cells derived from human periodontal ligament (pg/ml)

	2 day	4 day	6 day
control	6,878±2,453	15,702±26	9,415±1,331
10% O <sub>2</sub>	5,088±1,247	16,785±141	19,463±2,277
90% O <sub>2</sub>	12,173±4,631	16,084±684	28,317±11,200* <sup>†</sup>

\* Statistically significant(control vs 90%, 2 day vs 6 day)(P<0.001)

<sup>†</sup>Statistically significant(4 day vs 6 day) (P<0.05)

**Table V.** Effect of oxygen tension on the production of TNF-α in the cells derived from periodontal ligament (pg /ml)

	2 day	4 day	6 day
control	543± 543	2,624±1,162	2,877±2,333
10% O <sub>2</sub>	2,164± 658	1,849±1,305	7,247±1,287
90% O <sub>2</sub>	3,615±2,982	2,041± 641	19,019±9,738***

\* Statistically significant(control vs 90%, 2 day vs 6 day)(P<0.001)

\*\*\*Statistically significant(4 day vs 6 day) (P<0.05)

**Table VI.** Effect of oxygen tension on the production of IL-1β in the cells derived from periodontal ligament (pg /ml)

	2 day	4 day	6 day
control	1 ± 1	57 ± 22	187 ± 187
10% O <sub>2</sub>	10 ± 8	1 ± 1	16 ± 16
90% O <sub>2</sub>	6 ± 3	1 ± 1	304 ± 160

때 증가하는 것으로 나타났다(Table VI, Fig. 6).

### IV. 총괄 및 고안

치아에 교정력을 가하여 치아 이동을 이룰 수 있는 것은 치조골의 골 개조(bone remodeling)가 일어나기 때문이다. 어떤 세포들이 어떤 역할을 수행함으로써 골개조가 이루어지는가를 알아보는 일은 물론, 이 세포들이 어떻게 자극을 인지할 수 있으며 세포 상호간에 전달할 수 있는가를 밝혀보는 것도 치아 이동 기

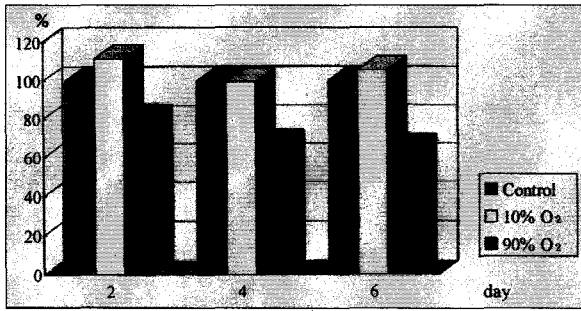


Fig. 1. Effect of oxygen tension on cellular activity

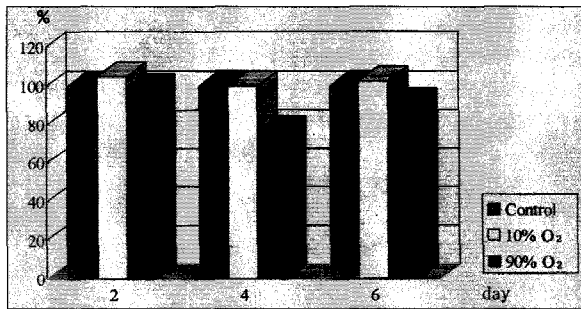


Fig. 2. Effect of oxygen tension on the production of total protein

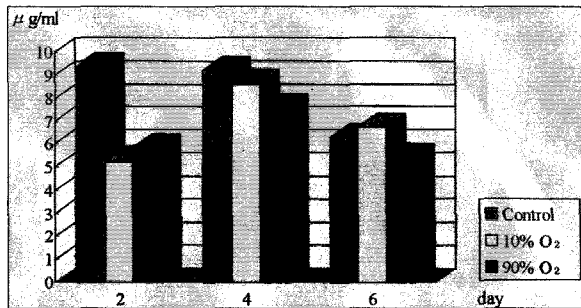


Fig. 3. Effect of oxygen tension on the collagen production

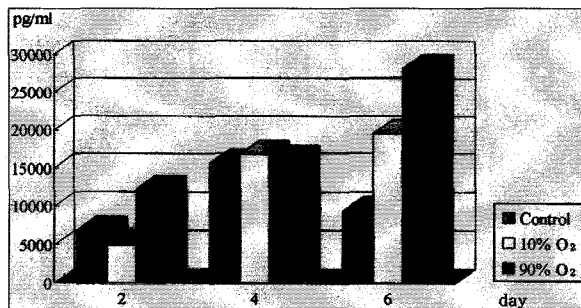


Fig. 4. Effect of oxygen tension on the production of IL-6

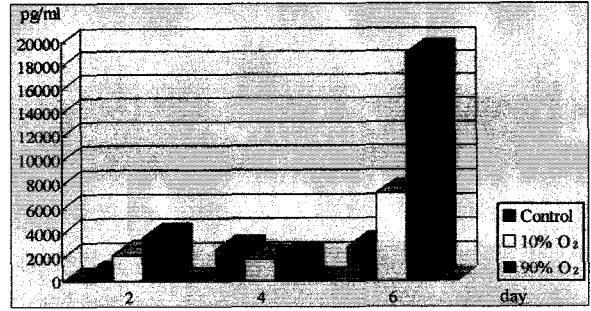


Fig. 5. Effect of oxygen tension on the production of TNF-α

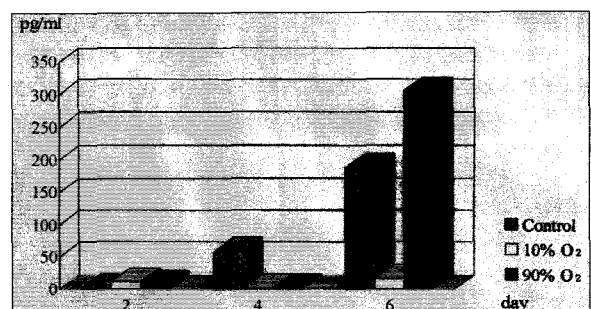


Fig. 6. Effect of oxygen tension on the production of TNF-β

전을 이해하는데 있어서 중요하다고 하겠다.

골 개조를 자극하는 요소로 구조적, 혈액적, 세포적, 환경적 인자들을 들 수 있으며 산소는 세포 환경을 이루는데 있어 중요하다<sup>45)</sup>. Goldhaber 등<sup>26)</sup>은 산소 분압과 골 개조간에 상관 관계가 있다고 하였으며 Khouw 등<sup>36)</sup>도 교정적 치아 이동 중 산소 분압과 치조골의 개조간에는 상관 관계가 있다고 하였다. Brighton 등<sup>23)</sup>은 산소 장력이 골단 성장판의 성장을 결정하는 생리적 기전이라고 하였다.

Tuncay 등<sup>63)</sup>은 압박받은 치주인대조직에서 혈관 및 조직액이 빠져나와 저산소 부위가 생기고 세포대사에도 중요한 변화가 생겨 결국 골 개조가 일어난다고 하였으며 실제 scanning microfluorimetry<sup>47)</sup>를 도입하여 치아-치조골 조직의 산화환원 상태를 측정 보고한 바 있다<sup>59)61)</sup>. 또한 이들은 산소 장력이 골아세포의 기능을 조절한다는 연구에서 압박을 받는 치주조직에서는 혈류의 정지 및 재개 등의 변화로 정상 산소 상태-저산소 상태-정상 산소 상태라는 일련의 변화가 생기고 견인력을 받는 곳에서는 혈관 확대<sup>62)</sup>로 정상 산소 상태에서 과산소 상태로 변화가 일어난다고 설명하였다.

산소 조건이 교정적 치아 이동에 미치는 영향을 생체 내에서 연구하는 것은 많은 문제점으로 행하기 어려우므로 본 연구에서는 사람의 치주인대에서 유래한 세포에 다른 산소 장력을 주기 위해서 산소를 각각 10%, 90%로 하고, 이산화탄소는 세포 생육에 최적 조건인 5%로 유지하고 나머지는 질소로 채웠다. 세균 감염의 문제를 해결하기 위해 0.2 $\mu$ m Millipore filter를 부착한 Gaspack system에 가스를 연결시켜 교환해줌으로써 세포 배양액내의 pH에 큰 변화를 주지 않으면서 저산소 조건과 과산소 조건을 형성해줄 수 있었다.

세포 활성을 평가하기 위해 세포 증식과 성장을 대조군과 비교한 결과(Table I, Fig. 1) 저산소군에서는 대조군과 같은 정도이었고 과산소군에서는 낮아서 배양기간이 길어질수록 두 군간의 차이가 커져 6일 후에는 유의한 차이를 보였다. 이는 사람의 치근막세포가 10% 산소 농도에서 증식이 변하지 않았다는 Kubota<sup>37)</sup>의 보고와 같은 결과이며 Bradley 등<sup>20)</sup>이 백서에서 유래한 섬유아세포 증식이 저산소 상태에서 촉진된다고 보고한 것보다 크게 다르지 않다고 생각된다. Tuncay 등<sup>35)</sup>에 의하면 백서의 골아세포는 10% 산소 조건에서 세포 증식이 급격히 증가하고 90% 산소 조건에서 억제되었다고 하였다. 이것으로 미루어 세포 종류에 따라 산소 조건에 대한 증식의 변화에 차이가 있을 수 있다고 생각된다.

세포가 성장, 분화하는데는 정상적인 효소와 단백질 합성이 이루어져야 하므로 본 연구에서는 총 단백질 생산을 SRB 측정법<sup>35)</sup>을 이용하여 대조군과 상대적인 합성 정도로 비교한 결과(Table II, Fig. 2) 저산소 조건은 단백질 합성에 별 영향을 미치지 않은 것으로 보이며 과산소군에서 4일 후 일시 감소되었으나 다시 회복되는 양상을 볼 수 있었다. 이는 앞서 Han 등<sup>28-30)</sup>이 실험동물을 출생 직후 시기에 완전 무산소 조건에 노출시켜서 여러 세포와 기관에 미친 영향을 알아본 다수의 연구들을 통해 아미노산의 단백질로의 결합이나 단백질 합성이 즉시 감소하지만 일시적인 것으로 회복된다고 보고한 것과 차이를 나타낸다. 이는 완전한 무산소 조건이 아닌 10% 농도의 산소를 주었으며 대상이 실험동물이 아니라 배양한 인체 세포이었다는 것에서도 찾을 수 있을 것이다. 본 연구에서는 저산소군보다 과산소군에서 총 단백질 합성의 감소를 보였다.

본 연구 결과 총단백질 합성과 교원질 합성의 정도로 볼 때 저산소 조건이나 과산소 조건이 세포 기능

을 억제하는 영향을 미치는 것이라고 하기는 어렵다. 과산소군에서 세포 활성이 억제된 만큼 총 단백질 합성 감소가 일어나지 않고 다시 회복되는 경향에서 세포의 활성이 낮아졌어도 기능을 수행하고 있음을 알 수 있다.

최근 세포의 기질은 단순한 기계적 지지뿐 아니라 세포의 이동, 성장, 분화에 필수적인 유전 정보를 세포에 전달하는 작용을 한다<sup>58)</sup>고 보고되고 있다. 즉, 세포체질(cytoskeleton)의 재구성을 유도하거나 세포내 자극 전달 경로를 자극하여 기질 수용체가 환경의 감지기로서의 역할을 하며, 성장 인자나 cytokine 등이 세포의 기질 분자에 결합하는 정도로 이들의 활성을 조절할 수 있다<sup>58)</sup>고 한다. 따라서 정상 환경이 교란되면 세포 이동, 기질 분해, 세포의 기질에 결합된 성장 인자의 발현, 세포 증식, 혈관 생성, 기질 합성 그리고 원래 조직 형태로의 재현을 자극한다<sup>58)</sup>고 한다.

세포의 기질중 인체 총단백질의 1/3을 차지하는 교원질은 지금까지 14가지가 알려져 있으며 다른 세포와 기질들과 기능적 구조적으로 밀접하게 연결되어 있고 치주인대 단백질의 대부분을 차지하고 있다. Meikle 등<sup>42)</sup>은 인장력을 가했을 때 제Ⅲ형 교원질량이 증가된다고 하였으며, 결합조직 세포의 생리학 환경이 합성되는 교원질 형태를 결정하는 중요한 인자이나 물질 대사에 미치는 영향에 기인할 수도 있다고 하였다. Hasegawa<sup>31)</sup>는 배양한 골세포를 기계적으로 신장시켰을때 교원성 단백질의 합성량은 변화가 없었다고 하였다. 특히 산소는 교원질 생합성의 hydroxylation에 보조인자로서 Yen 등<sup>65)</sup>은 산소 분압이 낮을 경우 교원질의 underhydroxylation이 일어나며 높은 경우에는 생체내 유형과 비교할 만한 교원질 합성이 일어난다고 하였고 김 등<sup>2)</sup>은 interferon- $\gamma$ 가 치주인대 세포의 교원질 합성과 alkaline phosphatase의 활성을 억제한다고 하였다. 본 연구 결과(Table III, Fig. 3) 저산소군에서 교원질 합성이 처음에는 대조군보다 낮았다가 배양기간이 길어질수록 증가되어 Tuncay 등<sup>62)</sup>이 골아세포에서 보고한 것과 상이하게 나타난 반면 과산소군에서는 점차 증가를 보여 이들의 결과와 일치하고 있는데 세포의 종류에 따라 각각의 기능이 다르므로 산소 조건의 변화가 교원질 합성에 미치는 영향도 달랐을 것으로 생각된다. 그리고 시간 경과에 따라 두 실험군과 대조군의 차이가 적어지는 것을 볼 수 있었으며 앞으로 물리적 외력을 함께 적용시키고 교원질 유형의 변화에 관해 알아보는 것

도 의의가 있으리라 생각된다.

치아를 이동하기 위해 가한 교정력은 치주조직에는 해로운 것으로서, 치주조직은 급성 염증 반응을 나타내는 것으로 알려져 있으며<sup>56)</sup> 조직 손상에 관여하는 prostaglandin, neurotransmitter, cytokine 등이 치주조직내에서 생성되고 작용한다<sup>24)</sup>고 보고되었으며 일부는 면역조직학적으로 존재가 확인되었다<sup>24)</sup>. cytokine 중 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 는 골 흡수에 깊이 작용하며 면역세포를 비롯한 여러 세포로부터 생산, 분비되는 것으로 알려져있다<sup>48)</sup>.

본 연구에서 치주인대 유래 세포가 생산, 분비한 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 측정 한 결과(Table IV-VI, Fig. 4-6), 교원질 합성과는 반대로 저산소균과 과산소균에서 대조군에 비해 증가하였으며 특히 세가지 모두 과산소균에서 급격히 증가한 것을 볼 수 있었다. 양에 있어서는 IL-6가 가장 많았고 IL-1 $\beta$ 는 IL-6와 TNF- $\alpha$  보다 훨씬 적었다.

골 개조 과정에서 골 흡수가 일어나기 위해서는 골아세포에 의해 파골세포가 활성화되어야 하며<sup>56)</sup> IL-6는 골아세포가 분비하는 cytokine이다. 더불어 견인측에서도 과산소 조건만 형성되기보다 세부적인 해부 구조에 따라 다르게 산소 장력이 형성될 수 있으며, 골 형성만 일어나는 것이 아니라 우선 기존 골의 일부가 흡수되고 나서 새로운 골이 형성된다는 사실이 이런 결과를 이해하는데 도움이 될 것이다. 또한 산소 장력의 변화로 치주 인대 유래 세포에서 생산된 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 가 증가함으로써 치주조직내 인접하는 다른 세포들에 미치는 영향이 더욱 강력하고 광범위해질 것으로 생각된다.

본 연구 결과로부터 산소 장력의 변화는 치주인대 유래 세포의 성장과 증식에 변화를 가져오기보다 기능에 더 많은 영향을 주며, 특히 골 흡수에 관여하는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  생산에 큰 변화를 가져온 것으로 보인다. 그러나 실제로 생체내에서 일어나는 산소 장력의 변화는 실험실 조건과 다를 것이며 주위 환경 및 세포 상호간에 다양한 작용 등 고려해야 할 요소가 많으므로 결과를 해석함에 주의해야 할 것이다.

### 참고 문헌

1. 구중희, 이기수: 백서의 교정적 치아 이동중 압박측 치주조직의 초기 변화에 관한 연구, 대치교정지, 19:21-29, 1989.
2. 김광석, 성재현, 최제용, 유현모: INF- $\gamma$ 가 치주인대 세포의 collagen 및 fibronectin의 합성과 alkaline phosphatase 활성화에 미치는 영향, 대치교정지, 23:229-248, 1993.

3. 김기영: Collagen 대사이상에 의한 질환과 이에 관여하는 물질들, 원광생체재료매시, 4(1):33-40, 1995.
4. 김미정, 양원식: 실험적 치아이동시 선견 치주조직의 변화에 대한 면역조직화학적 연구, 대치교정지, 14:187-202, 1993.
5. 김선해, 서정훈: 간헐적 교정력에 의한 백서 구치 치주조직의 변화에 관한 실험적 연구, 대치교정지, 19:57-74, 1989.
6. 김영복, 이종훈, 양원식: 외인성 전류가 고양이 치조골의 cyclic nucleotides에 미치는 영향에 관한 연구, 대치교정지, 14:187-202, 1984.
7. 김정호, 서정훈: 수종의 cytokine이 사람 치주인대 섬유아세포의 prostaglandin E2, leukotriene B4 및 collagenase 생산에 미치는 영향, 대치교정지, 24:871-884, 1994.
8. 김종태, 김중수, 양원식: 교정력 및 외인성 전류가 고양이 치조골의 prostaglandin E2에 미치는 영향에 대한 연구, 대치교정지, 14:213-216, 1984.
9. 김형수, 남동석: 교정력이 치조골의 효소활성에 미치는 영향, 대치교정지, 22:297-308, 1992.
10. 김혜경, 이종훈, 양원식: 교정력에 의한 고양이 치조골의 칼슘 및 인의 분포에 관한 연구, 대치교정지, 11:17-24, 1981.
11. 송요선, 이기수: 백서구치의 교정적 치아이동중 압박측 치조골의 골개조에 관한 연구, 대치교정지, 19:37-55, 1989.
12. 안 대식, 이종훈, 양원식: 교정력에 의한 치조골의 cyclic AMP에 관한 연구, 대치교정지, 11:7-15, 1981.
13. 이강희, 서정훈: Prostaglandin E<sub>2</sub>가 치아이동과 치근흡수에 미치는 영향에 관한 연구, 대치교정지, 19:25-36, 1989.
14. 이승연, 김태우, 장영일: 실험적 전치 정출시 원숭이 하악 치주조직의 변화, 대치교정지, 25:403-414, 1995.
15. 이인환, 유영규: Guinea pig에서 실험적 치아이동에 따른 압박측 치아주위조직의 변화에 관한 전자현미경적 연구, 대치교정지, 13:165-176, 1983.
16. 이정훈, 이기수: 백서 구치의 치아이동중 장력측 치주조직의 반응에 관한 전자현미경적 연구, 대치교정지, 17:223-234, 1987.
17. 임용규, 양원식: 백서구치의 실험적 치아이동시 치근막 혈관 변화에 관한 혈관주형법을 이용한 연구, 대치교정지, 24:37-62, 1994.
18. 임진환, 양원식: 실험적 치아이동시 나타나는 백서 치주조직의 변화에 대한 조직학적 및 조직화학적 연구, 대치교정지, 6:33-39, 1976.
19. 장지우, 유영규: 실험적 치아 이동시 견인측 치주조직에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 연구, 대치교정지, 14:65-73, 1984.
20. 한희성, 김정근, 장영일: 수종의 cytokine이 배양중인 백서태자 유사조골세포의 기능에 미치는 영향, 대치교정지, 25:689-696, 1995.
21. 현성욱, 서정훈: 실험적 치아이동시 백서 상악절치 치근막의 혈관 변화에 대한 연구, 대치교정지, 18:311-327, 1988.
22. Bradley, tr., Hodgson, G.S.Rosendaal, M.: The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation in vitro, J. Cell Physiol., 97:517-522, 1988.
23. Brighton, C.T., Heppenstall, R.B.: Oxygen tension in zone of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis, J. of



- Bone and Joint Surg., 53: 719-728, 1971.
24. Davidovitch, Z., Nicolay, O.F., Ngan, P.W., Shanfeld, J.L.: Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics, *Dental Clinics of North Am.*, 32:411-435, 1988.
  25. Deren, J.A., Kaplan, K.S., Brington, C.T.: Alkaline phosphatase production by periosteal cells at various oxygen tension in vitro, *Clin.Orthopaedics & related research*, 252:307-312, 1990.
  26. Goldhaber, P.: Remodeling of bone in tissue culture, *J. Dent. Res.*, 45, suppl3:490-499, 1966.
  27. Göz, G.R., Rahn, B.A., Schulte-Montig, J.: The effects of horizontal tooth loading on the circulation and width the periodontal ligament—an experimental study on beagle dog, *Eur. J. Orthod.*, 14:21-25, 1992.
  28. Han, S.S., Kim, J.H.: Studies on hypoxia V. effects of anoxia on developing connective tissue cells in rats, *Anat. Rec.*, 165(4):531-41, 1969.
  29. Han, S.S., Kim, J.H., Burdi, A.R.: Studies on hypoxia VII. effect of prenatal anoxia on leucine-<sup>3</sup>H incorporation of neonatal rat pancreas and submandibular gland, *Pro. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 136(1):191-5, 1971.
  30. Han, S.S., Smith, D.M.: Studies on hypoxia:II Autoradiographic quantitation of proline-<sup>3</sup>H incorporation by connective tissue cells of the neonatal hamster, *J. D. Res.*, 47(2):244-51, 1968.
  31. Hasegawa, S., Sato, S.: Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters pattern of protein synthesis, *Calcif. Tissue. Int.*, 37:431-436, 1985.
  32. Hemley, S.: The clinical significance of tissue changes incident to tooth movement, *Am. J. Orthod.*, 41:5-26, 1955.
  33. Hixon, E.H., Callow, G.E., McDonald, H.W., Tacy, R.: Optimal force, Differential force, and anchorage, *Am. J. Orthod.*, 55:437-457, 1965.
  34. Jamall, I.S., Finelli, V.N., Que Hee S.: A single method to determine nanogram of levels of 4-hydroxyproline in biological tissue, *Anal. Biochem.*, 112:70-75, 1981.
  35. Keeper, Y.P., Piazio, P.E., Peter, G.J.: Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium(MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing, *Eur. J. Cancer*, 27:897-900, 1991.
  36. Khouw, F.E., Goldhaber, P.: Changes in vasculature of the periodontium associated with tooth movement in the rhesus monkey and dog, *Arch. Oral Biol.*, 15:1125-1132, 1970.
  37. Kubota, M.: Study on proliferation and function of periodontal ligament fibroblasts and osteoblastic cells under hypoxia, *kokubyo-gakkai-zasshi*, 56:21-32, 1989.
  38. Kuflinec, M.M.: Vascular changes due to the application of force to the molar teeth in hamster, *J. Dent. Res.*, 47:916-918, 1968.
  39. Kvinnsland, S., Heyeraas, K., Ofjord, E.S.: Effect of experimental tooth movement on periodontal and pulpal blood flow, *Eur. J. Orthod.*, 11: 200-205, 1989.
  40. Lin, W.L., Christopher, A.G., McCulloch, Cho, M.I.: Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat, *Anat. Rec.*, 40:492-506, 1994.
  41. Macapanpan, L.C., Weinmann, J.P., Brodie, A.G.: Early tissue changes following tooth movement in rats, *Angle Orthod.*, 24:79-95, 1954.
  42. Meikle, M.C., Heath, J.K., Hembry, R.M.: Rabbit cranial suture fibroblasts under tension express a different collagen phenotype, *Arch. Oral Biol.*, 27:609-613, 1982.
  43. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983.
  44. Moxam, B.J., Shore, R.C., Berkoviz, B.K.B.: Fenestrated capillaries in the periodontal ligaments of the erupting and erupted rat molar, *Arch. Oral Biol.* 32:477-481, 1987.
  45. Ninikoski, J., Heughan, C.: Oxygen and carbon dioxide tensions in experimental wounds, *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 133:1003-1007, 1971.
  46. Nojima, N., Kobayashi, M., Shionome, M., Takahashi, N., Suda, T., Hasegawa, K.: Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts, *J. Periodont. Res.*, 25:179-185, 1990.
  47. Quistorff, B., Haselgrove, J.C., Chance, B.: High spatial resolution readout of 3-D metabolic organ structure: An automated, low-temperature redox ratio-scanning instrument, *Anal. Biochem.*, 148:389-400, 1985.
  48. Ragnarsson, B., Carr, G., Daniel, J.C.: Isolation and growth human periodontal ligament cells in vitro, *J. Dent. Res.*, 64: 1026-1030, 1985.
  49. Robers, W.E., Chase, D.C., Jee, W.S.: Kinetics of cell proliferation and migration associated with orthodontically-induced osteogenesis, *J. Dent. Res.*, 60:174-181, 1981.
  50. Robers, W.E., Morey, E.R.: Proliferation and differentiation sequence of osteoblast histogenesis under physiological conditions in rat periodontal ligament, *Am. J. Anat.*, 174: 105-118, 1985.
  51. Rygh, P.: Activation of the vascular system: A main mediator of periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement, *Am. J. Orthod.*, 89:453-468, 1986.
  52. Rygh, P.: Elimination of hyalinized periodontal tissues associated with orthodontic tooth movement, *Scand. J. Dent. Res.*, 82:57-73, 1974.
  53. Rygh, P.: Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement, *Acta. Odont. Scand.*, 30:575-593, 1972.
  54. Rygh, P.: Ultrastructural changes of the periodontal fibers and their attachment in rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement, *Scand. J. Dent. Res.*, 81:467-480, 1973.

55. Rygh, P.: Ultrastructural vascular changes in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement, *Scand. J. Dent. Res.*, 80:307-321, 1972.
56. 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.*, 103:212-222, 1993.
57. Sandy, J.R.: Tooth eruption and orthodontic movement, *Br. Dent. J.*, 172:141-1351, 1992.
58. Schuppan, D., Somasundaram, R., Dierrich, W., Ehnis, T., Bauer, M.: The extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation, *Annals New York Academy of science*, 733:87-102, 1994.
59. Shapiro, I.M., Golub, E.E., Kakuta, S.: Initiation of endochondral calcification is related to changes in the redox state of hypertrophic chondrocytes, *Science*, 217:950-952, 1982.
60. Stern, B., Glimcher, M.J., Goldhaber, P.: The effect of various oxygen tensions on the synthesis and degradation of bone collagen in tissue culture, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121: 869-872, 1966.
61. Tuncay, O.C., Frasca, H.P., Shapiro, I.M.: Scanning micro-fluorimetric measurements of redox status in the rat dento-alveolar tissues, *Arch. Oral Biol.*, 35:113-118, 1990.
62. Tuncay, O.C., Ho, D., Barker, M.K.: Oxygen tension regulates osteoblast function, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 105:457-463, 1994.
63. Tuncay, O.C., Shapiro, I.M.: A possible role for hypoxia in cellular energy metabolism of calcified tissues. In: Norton LA, Burstone, C.J., eds. *The biology of tooth movement*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 249-264, 1989.
64. Yamashita, Y., Sato, M., Noguchi, T.: Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey, *Arch. Oral Biol.*, 32:677-678, 1987.
65. Yen, E.H.K., Sodek, J., Melcher, A.H.: The effect of oxygen partial pressure on protein synthesis and collagen hydroxylation by mature periodontal tissues maintained in organ culture, *Biochem. J.*, 178:605-612, 1979.
66. Yoo, S.K., Kim, K.J., Shin, H.S., Park, J.K., Jeon, B.H.: Development of in vitro gingiva hyperplasia model and drug to treat gingival hyperplasia, *Korean J. Oral Biol.*, 18(2):121-126, 1994.

- ABSTRACT -

## EFFECT OF OXYGEN TENSION ON THE ACTIVITY AND FUNCTION OF THE CELLS DERIVED FROM HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT

Muyng-Hee Sa, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Won-Sik Yang, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,

*Dept. of Orthodontics, College of Dentistry, Seoul National University*

This study was undertaken to investigate the effect of oxygen tension on the activity and function of the cells derived from human periodontal ligament by measuring cell activity, total protein synthesis, collagen synthesis, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ .

Human periodontal ligament fibroblasts were collected from premolars extracted for orthodontic treatment and incubated in the environment of 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% humidity. After the fifth to sixth passage they were used for the experiment. Gaspack system to which 0.2 $\mu$ m Millipore filter was attached was connected to mixed-gas tanks. The mixed gases were composed of 10% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub> in hypoxic group or 90% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% N<sub>2</sub> in hyperoxic group and 5% CO<sub>2</sub>, 95% air for control. After incubation in 37°C for 2, 4, 6 days, cell activity was determined by tetrazolium(MTT) assay and total protein synthesis was assayed using sulforhodamine B(SRB). And measurement of 4-hydroxyproline was performed to assess collagen synthesis and IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured by enzymeimmunoassay.

The results were as follows.

1. The cell activity and total protein synthesis in hypoxic group were a little higher than or almost the same with those in control group.

2. In hyperoxic group, the cell activity was lower than that in control group and total protein synthesis was decreased.
3. Collagen synthesis was significantly decreased initially in both hypoxic and hyperoxic group and increased nearly to the level of control group as the duration of cell incubation was longer.
4. As a result of enzymeimmunoassay, the amount of cytokines was IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in order.
5. IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were increased more rapidly in both hypoxic and hyperoxic group than in control group as the duration of cell incubation was longer.
6. There were more IL-6 and TNF- $\alpha$  in hyperoxic group than in control group after 6 days, and there were more IL-6 and TNF- $\alpha$  after 6 days than after 2 or 4 days in hyperoxic group.

These results suggested that oxygen tension might modulate the production of extracellular matrix and cytokines in the cells derived from human periodontal ligament.

KOREA. J. ORTHOD. 1997 ; 27 : 503-513

※ **Key words** : oxygen tension, cell activity, extracellular matrix, Interleukin-6, Tumor necrosis factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$