

# 백서의 치주인대세포와 두개관세포의 혼합배양이 석회화과정에 미치는 영향

김지숙 · 박준봉 · 이만섭 · 권영혁 · 허 익 · 임상철

경희대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

치주치료의 궁극적 목적이 과거의 상실된 부착기구의 회복이라는 측면에서 치주조직의 완전한 재생을 이루는 쪽으로 진행된지 이미 오래인 지금 이들 조직의 재생에 관여하는 세포의 기원과 상호작용에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 여러 치주조직중에서도 치조골의 재생은 치아의 기능뿐 아니라 심미성 및 나가서는 매식치를 식립하는데 있어서도 중요한 요건이 되지만 치조골을 이루는 세포의 기원과 분화에 대해서는 아직까지도 많은 논란의 대상이 되고있다.

Gould와 Melcher등(1977, 1980)<sup>1, 2)</sup>은 쥐를 대상으로 하여 치주조직에 인위적으로 손상을 준후 발생하는 세포분화의 위치 및 양상을 연구한 결과 치주인대와 치조골을 구성하는 전구세포가 치조골에 인접한 혈관과 치주인대내에 존재하는 혈관주위로부터 기원한다고 보고하였고 McCulloch와 Melchler등(1983a, b)<sup>3, 4)</sup>은 혈관주위로부터 기원한 전구세포가 치조골로 이동하여 조골세포로 분화한다고 주장하였다. 그러나, 또다른 연구를 통해 McCulloch등(1987)<sup>5)</sup>은 치주인대내에 존재하는 조골세포 및 조백악세포는 치조골의 골내

막강에서 기원하는 것이며 이들이 혈행로를 통해 치주인대로 이동하여 존재하는 것이라고 주장하였다.

이와같이 치조골 재생에 관여하는 전구세포의 기원과 분화에 대해서 아직까지도 규명되지 않고 있는 이유로는 조골세포에 대한 확실한 표지(Marker)가 발견되지 않았다는 점과 치주인대 세포가 일부 조골세포와 유사한 성질을 가지고 있다는 점을 들 수 있다. Melcher(1976)<sup>6)</sup>가 치주인대와 접해있는 치조골의 침착과 흡수가 치주인대로 부터 유래된 세포에 의해 이루어진다고 주장한 이래 Nyman등(1982)<sup>7)</sup>은 골결손부위에 차폐막을 이용하여 상피세포 및 치은 결합조직의 세포를 배제하고 치주인대에서 유래되는 세포만을 증식시키는 조직유도재생술을 시행하여 신생백악질 및 결합조직부착이 형성됨을 보고함으로써 치주인대가 치주조직의 재생을 이루는 주요 세포원임을 밝혔다.

Arceo등(1991)<sup>8)</sup>은 인간의 치주인대세포와 치은섬유아세포를 배양하여 alkaline phosphatase(ALPase)활성도와 석회화결절 형성 정도를 비교한 실험을 시행한결과 치주인대세포가 현저히 높은 ALPase 활성도를 보이며 Na- $\beta$ -glycerophosphate, ascorbic acid,

dexamethasone을 첨가한 조건배지에서 배양 시에 치주인대세포만이 석회화 결절을 형성함을 관찰하였기에 치주인대 세포가 경조직 형성에 기여한다고 주장하였다. 또한 Cho등(1992)<sup>9)</sup>은 쥐의 치주인대세포를 다양한 조건 배지에서 배양한 결과 ascorbic acid, Na- $\beta$ -glycerophosphate, dexamethasone을 포함한 배지에서 석회화 결절이 형성됨을 보고하였으나 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰했을 때 결절상에서 조골세포나 골세포가 발견되지 않았고 기질세포도 존재하지 않았기 때문에 형성된 석회화 결절이 골결절과는 형태적으로 다른 무세포성 백악질이라고 추정하였다.

그러나, Mukai등(1993)<sup>10)</sup>은 또다른 실험을 통해 치주인대에 의해 형성된 석회화 결절내에 조골세포와 골세포, 기질세포의 존재를 확인함으로써 치주인대세포가 조골세포로 분화할 수 있는 전구세포의 성질을 가졌다고 주장하였다.

이와 같이 실험의 결과가 조금씩 다른 이유는 배지의 조건과 세포의 세대수 그리고 어느 종의 치주인대 세포를 사용하느냐에 따라 차이가 날 수 있기 때문이지만 그럼에도 불구하고 치주인대 세포가 일부 조골세포와 유사한 성질을 갖고 있다는 것은 거의 확실한 사실로써 받아들여지고 있다. 그러나, 전형적인 조골세포는 이외에도 부갑상선 호르몬 및 Prostaglandin E<sub>2</sub>에 대한 반응으로 cAMP의 증가를 보이고 osteocalcin과 같은 골관련 단백질 생성하며 제 1형 교원질만을 생성한다는<sup>11-13)</sup> 특성을 보이고 있기 때문에 조골세포가 치주인대에서 유래한다는 가설을 완전히 받아들일 수는 없는 것이다.

한편, 치조골 형성에 관여하는 조골세포가 골조직으로부터 유래한다는 가설을 뒷받침하는 연구 또한 다양하게 이루어져 왔다. Melcher등(1986)<sup>14)</sup>은 쥐의 두개골과 사람의 치은조직, 쥐의 치주인대 조직으로부터 세포

를 채취하여 ascorbic acid와 Na- $\beta$ -glycerophosphate를 포함한 조건 배지에서 치근절편과 함께 배양하여 실험한 결과 두개골 세포만이 석회화 결절을 형성하고 치주인대 세포와 치은 섬유아세포는 결절을 형성하지 않음을 보임으로써 골조직으로 부터 유래된 세포만이 골형성에 관여한다고 주장하였다. 이외에도 Gotoh(1990)등<sup>12)</sup>은 사람의 상악골로부터 골세포를 분리 배양하여 실험한 결과 높은 ALPase활성도와 부갑상선 호르몬 및 PGE<sub>2</sub>에 대한 cAMP의 증가를 보이고 ascorbic acid, N- $\beta$ -glycerophosphate가 포함된 조건배지에서 약 4 주후 석회화 결절이 형성됨을 관찰하였다. 또한 이를 전자현미경으로 관찰하면 결절속에 기질세포가 존재함을 확인할 수 있었고 energy dispersive X-ray analyser로 분석한 결과 수산화인회석 구조임을 밝혀냄으로써 형성된 석회화 결절이 골과 유사한 조직이라고 결론지었다.

이와같이 치조골재생에 관여하는 전구세포가 치주인대 혹은 치조골에서 기원한다는 각각의 가설을 뒷받침하는 많은 연구가 진행되어 왔으나 조골세포에 대한 확실한 표지가 없는 현재로서는 어느 한가지 가설만으로 정설화 하기는 어려운 일이다.

치조골 파괴의 경우 그 치유과정은 두 개의 경조직 사이에 콜라젠 섬유라는 연조직이 존재하는 구조적 특이성으로 외과적 치료후 이상적인 치유형태를 재현하기가 매우 어렵다. 또한 수술후 치주판막, 치근면 그리고 골면이 이루는 결손부 형태를 입체적으로 관찰하면 결손부 재생과정은 먼저 혈병이 형성된후 혈병내부로 치주인대세포와 골세포가 증식분화되어 궁극적으로 신생골조직이 형성되며 이러한 일련의 과정 중에 여러 성장인자들이 관여하여 세포의 화학주성 및 기질 형성을 자극하고 세포의 증식과 분화를 조절하게 된다. Park(1995)등<sup>15)</sup>은 혈소판유래성장인자를 사용한 경우 개의 3급 분지부병소에서 보다

빠르고 완전한 치주조직의 재생을 이룰 수 있음을 보임으로써 골 형성에 관여하는 치주인대세포의 증식을 자극한다고 보고하였다. 이와같이 생체내의 치주조직에는 여러가지 세포들이 상호간의 작용을 통하여 조직의 소실 및 재생과정을 수행하고 있기때문에 이러한 세포간의 작용을 보다 명확히 규명할 수 있는 연구가 필요하다고 생각된다.

따라서, 이번 실험의 목적은 치조골 재생에 관여한다고 여겨지는 두가지 세포, 즉 치주인대세포와 골세포를 단독 혹은 혼합배양하여 양자가 모두 석회화 결절을 형성할 수 있는지를 관찰하고 몇가지 분석을 통해 상호간에 어떠한 작용을 보이는지를 알아봄으로써 생체내에서의 치조골재생에 미치는 두 세포간의 작용에 대한 이해를 돕는데 있다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

연구대상으로는 생후 4주된 무게 100 그램 전후의 웅성 백서로부터 초기 배양한 치주인대세포와 두개관세포를 이용하였으며 실험동물은 모두 전신건강이 양호하며 임상적으로 염증이 없는 건강한 치주조직을 가지고 있었다.

#### (1) 두개관세포의 배양

실험동물에 Pentobarbital Sodium(Tokyo Industrial Chem., Japan) 30mg/kg 을 복강내 주사하여 전신마취시킨 후 70% 알콜로 두피를 세척 소독하고 두경부를 탈락시켜 희생하였다. 외과용 가위로 하악을 상악골에서 분리한후 두개관을 적출하고 연조직을 완전히 제거한후 200U/ml penicillin(Gibco, USA)과 200 µg/ml streptomycin(Gibco, USA) 이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, USA)에 5회 세척하였다. 두개관조직

을 #15 blade로 세절하고 35mm 세포 배양 접시에 고르게 분산시킨 다음 20% FBS와 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin이 포함된 DMEM으로 구성된 초기배양액을 넣고 3일 간격으로 배양액을 교환하면서 섭씨 37도, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합 배양기 (Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다. 두개관 세포가 조직 절편으로 부터 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층이 형성되면 0.05% Trypsin/0.02% EDTA를 처리하여 세포를 박리하고 초기배양액에서 FBS를 10%로 감소시키고 50µg/ml ascorbic acid, 10mM/ml Na-β-glycerphosphate, 10-7 dexamethason 을 첨가하여 이를 표준배양액으로 하였으며 1 : 3 으로 계대배양하여 Rat Calvaria Cell(이하RCV라 표기)이라 명명하고 3-5 세대의 세포를 실험에 사용하였다.

#### (2) 치주인대세포의 배양

치주인대를 발치와내에 잔존시키기 위해 치아의 발거전 5일동안 β-aminopropionitrile (Sigma chemical Co., U.S.A.)을 사료에 중량 1g 당 0.4%로 혼합하여 실험동물에 섭취시키고 Pentobarbital Sodium(Tokyo Industrial Chem., Japan)으로 전신마취한후 상악 좌,우측 제 1 대구치를 발거하였다. 치아 발거 2일후에 실험동물을 희생시키고 상악을 적출한후 발치와내의 혈병을 채취하여 배양접시 위에 놓고 광학현미경하에서 관찰하면서 치주인대조직만을 분리하여 두개관세포에서와 같은 조성의 생검배지로 5 회 세척한후 동일한 방법으로 배양하여 Rat Periodontal Ligament Cell(이하 RPD라 표기) 이라 명명하고 3-5 세대의 세포를 실험에 사용하였다.

## 2. 연구방법

### (1) 실험군 설정

두세포의 혼합비율을 달리하여 다섯군을 설

정하였다. 두개관세포 대 치주인대 세포의 비율을 각각 10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10으로 하여 1 군부터 5 군까지를 정하였고 총세포수는 다섯군이 모두 동일하게 하였다.

### (2) 세포증식율 측정

24 well 배양접시(Corning Co., USA)에 다섯군의 세포를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하고 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10mM/ml Na- $\beta$ -glycerphosphate, 10<sup>-7</sup>dexamethason 이 포함된 DMEM 배지에서 섭씨 37도, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합 배양기 (Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다. 대조군은 배지의조성을 달리하여 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 다섯군의 세포를 동일한 방법으로 배양하였다. 배양 1, 3, 7, 14, 20, 25일에 0.05% Trypsin/ 0.02% EDTA(Gibco, USA)로 처리하여 세포를 배양접시로부터 박리한 다음 hemocytometer를 이용하여 도립현미경(Olympus Co., Japan)하에서 세포수를 측정하였다.

### (3) 총단백질량 측정

35mm 배양접시에 다섯군의 세포를  $4 \times 10^6$ 개씩 분주하고 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10mM/ml Na- $\beta$ -glycerphosphate, 10<sup>-7</sup>dexamethason이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양 3, 6, 8 일에 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 0.05% Trypsin/0.02% EDTA(Gibco, USA)로 처리하여 세포를 배양접시로부터 박리한 다음 15,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 원침 후 상층액을 제거하고 0.5ml 증류수를 첨가한 후 sonic dismembrator (Fisher Scientific)로 초음파분쇄하고 다시 원심분리하여 상층액을 취해서 Bio-rad protein assay용 dye reagent와 반응시켰다. Vortexing

하여 실온에서 5분간 방치한후 595nm에서 UV-VIS spectrophotometer(Shimatsu Co., Japan) 로 흡광도를 측정한후 표준곡선을 기준으로 판정하였다.

### (4) Alkaline Phosphatase 활성도 측정

35mm 배양접시에 다섯군의 세포를  $4 \times 10^6$ 개씩 분주하고 총단백질량 측정법에서와 동일한 조성의 배지에서 배양하였다. 배양 3, 6, 8 일에 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 0.05% Trypsin/0.02% EDTA(Gibco, USA)로 처리하여 세포를 배양접시로 부터 박리한 다음 15,000 rpm 으로 5분간 원심분리하였다. 원침 후 상층액을 제거하고 0.5 ml 증류수를 첨가한 후 sonic dismembrator(Fisher Scientific)로 초음파분쇄하고 다시 원심분리하여 상층액을 취해서 알칼리성 인산분해효소 측정용 시약(ALP.K.Kit, 영동제약) 과 반응시킨후 500nm 에서 UV-VIS spectrophotometer (Shimatsu Co., Japan) 로 흡광도를 측정한후 표준곡선을 기준으로 판정하였다.

### (5) 석회화 결절의 관찰

35mm 배양접시에 다섯군의 세포를  $4 \times 10^6$ 개씩 분주하고 총단백질량 측정법에서와 동일한 조성의 배지에서 12일간 배양하였다. 매일 도립현미경하에서 석회화 결절의 형성 여부를 관찰하고 배양 12 일째에 용기내에서 배지를 제거하고 1.5% glutaraldehyde 용액으로 2 시간 동안 고정한 후 칼슘 침착부위를 확인하기 위해 Aizarin red S용액으로 5 분간 염색하였다. 도립현미경하에서 관찰후 1.5 $\times$ 1.5mm<sup>2</sup>의 격자내의 염색된 석회화 결절수를 측정하여 비교하였다.

### (6)통계분석

세포증식율, ALPase활성도, 총단백질량, 석회화 결절수의 비교에 있어서 Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 P < 0.01 수

준으로 실험군간의 유의성을 평가하였다.

### III. 연구성적

#### 1. 세포증식을 측정

두개관세포만으로 이루어진 1군, 두개관세포 70 % 와 치주인대세포 30 %로 혼합된 2군, 두개관세포 50% 와 치주인대세포 50 %로 혼합된 3군, 두개관세포 30 % 와 치주인대세포 70 %로 혼합된 4군, 치주인대세포만으로

이루어진 5군을 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배지(이하 표준배지)와 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10mM/ml Na- $\beta$ -glycerphosphate, 10<sup>-7</sup> dexamethason 이 포함된 DMEM 배지(이하 조건배지)에서 배양하여 1, 3, 7, 14, 20, 25일에 세포수를 측정하여 세포증식을 비교하였다.

표준배지에서 배양한 경우 1군과 2 군은 배양 20 일까지 지속적인 증가를 보이다가 25

표 1-1 Cell proliferation on mixed culture of rat calvaria cell and periodontal ligament cell

Group(cell mix ratio)	day	Number of cells					
		1	3	7*	14	20*	25
1(C10:P0)		1.00±0.00	4.00±0.21	5.08±0.11*	7.84±0.14	8.67±0.71*	6.41±1.04
2(C7:P3)		1.00±0.00	2.10±0.25	3.80±0.22*	3.92±0.76	6.71±0.52*	4.79±0.76
3(C5:P5)		1.00±0.00	2.04±0.26	3.00±0.10*	4.04±0.92	5.25±0.54*	5.83±0.39
4(C3:P7)		1.00±0.00	1.88±0.13	2.50±0.07*	2.50±0.33	4.54±0.52*	4.92±0.76
5(C0:P10)		1.00±0.00	1.00±0.13	0.91±0.07*	1.75±0.13	1.50±0.45*	2.00±0.25

Values are mean±S.E. , n=3.

\* : Statistically significant at P<0.01 by Duncan's Multiple Range Test.

C: Calvaria cell

P: Periodontal ligament cell

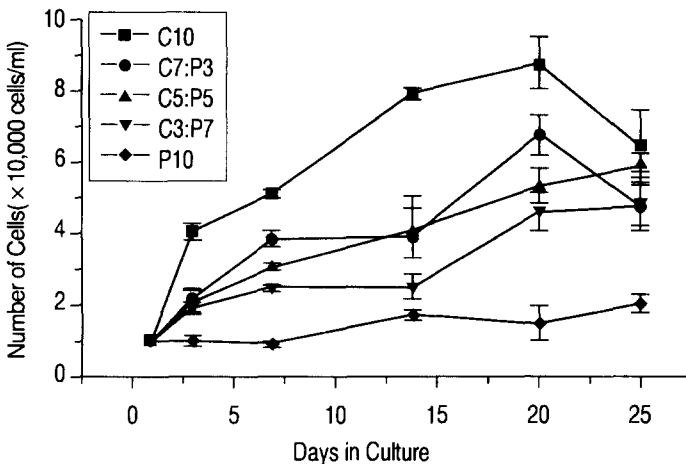


그림 1-1 Cell proliferation on mixed culture of rat periodontal ligament cell and calvaria cell

일에는 감소하는 양상을 나타냈으며 3군과 4 군은 배양 25 일까지 지속적인 증가를 보였고 5 군의 경우 배양 초기에는 별다른 차이를 나타내지않다가 14일과 25일에 다소 증가하였다. 배양 7일과 20일에 각군간의 세포수를 비교해보면 7일에 각각  $5.08 \pm 0.11$ ,  $3.80 \pm 0.22$ ,  $3.00 \pm 0.10$ ,  $2.50 \pm 0.07$ ,  $0.91 \pm 0.07$ 로서 1군에서 가장 많고 2군, 3 군, 4 군, 5군의 순서로유의 성있게 감소하였으며( $p < 0.01$ ) 20일에도 역시  $8.67 \pm 0.71$ ,  $6.71 \pm 0.52$ ,  $5.25 \pm 0.54$ ,  $4.54 \pm 0.52$ ,  $1.50 \pm 0.45$ 로 1군에서 가장 많고 2군, 3군, 4군,

5군의 순서로유의성있게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 이는 3일의 경우에서도 같은 양상을 보이나 유의성있는 차이를 나타내지는 않았으며 ( $p < 0.01$ ) 14일에는 1군에서 가장 많고 3군, 2군, 1군, 5군의 순서로 감소였고 25일에는 1군에서 가장 많고 3군, 4군, 2군, 5군의 순서로 감소함을 나타냈으나 유의성있는 차이를 나타내지는 않았다( $p < 0.01$ )(표 1-1, 그림 1-1).

조건배지에서 배양한 경우에는 모든군에서 표준배지에서 보다 느린 증식속도를 나타냈다. 1군, 2군, 3군의 경우 7일에 다소 감소한

표 1-2 Cell proliferation on mixed culture of rat calvaria cell and periodon

Group(cell mix ratio)	Number of cells						
	day	1	3	7*	14	20*	25
1(C10:P0)		$1.00 \pm 0.00$	$2.62 \pm 0.14^*$	$1.88 \pm 0.11$	$3.04 \pm 0.30^*$	$3.80 \pm 0.18$	$4.71 \pm 0.25$
2(C7:P3)		$1.00 \pm 0.00$	$1.79 \pm 0.13^*$	$1.63 \pm 0.12$	$2.29 \pm 0.13^*$	$2.63 \pm 0.21$	$5.20 \pm 0.20$
3(C5:P5)		$1.00 \pm 0.00$	$1.66 \pm 0.09^*$	$1.13 \pm 0.12A'$	$2.17 \pm 0.16^*$	$2.79 \pm 0.15$	$5.00 \pm 0.20$
4(C3:P7)		$1.00 \pm 0.00$	$1.42 \pm 0.07^*$	$1.18 \pm 0.09$	$1.89 \pm 0.17^*$	$2.48 \pm 0.21$	$2.42 \pm 0.09$
5(C0:P10)		$1.00 \pm 0.00$	$0.88 \pm 0.13^*$	$0.89 \pm 0.07$	$1.05 \pm 0.13^*$	$1.50 \pm 0.45$	$2.00 \pm 0.12$

Values are mean  $\pm$  S.E., n=3.

\* : Statistically significant at  $P < 0.01$  by Duncan's Multiple Range Test.

C: Calvaria cell

P: Periodontal ligament cell

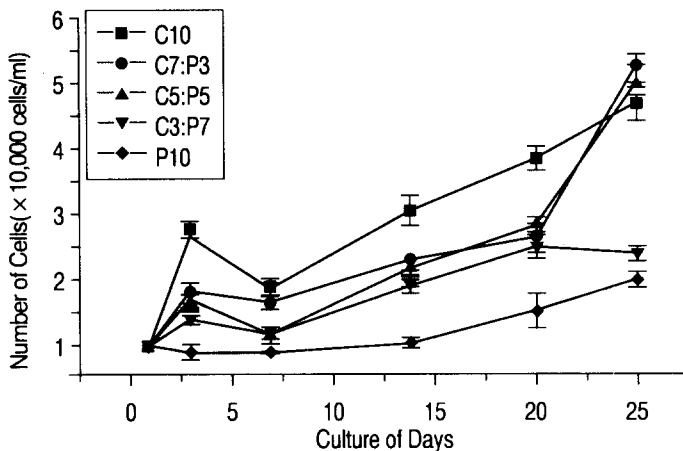


그림 1-2 Cell proliferation on mixed culture of rat periodontal ligament cell and calvaria cell in the conditioned media

후 25일 까지 지속적으로 증가하는 양상을 보였고 4군은 7일이후부터 20일까지 증가하다가 25일에 다소 감소하였고 5군은 7일이후부터 25일까지 완만히 증가하였다.

각군간의 세포수를 비교해보며 3일과 14일에는 1군에서 가장 많고 2군, 3군, 4군, 5군의 순서로 유의성있게 감소하였으며( $p < 0.01$ ) 7일에는 1군에서 가장 많고 2군, 4군, 3군, 5군의 순서를 보이고 20일에는 1군에서 가장 많고 3군, 2군, 4군, 5군의 순서를 보이며 25일에는 2군에서 가장 많고 3군, 1군, 4군, 5군의 순서

를 나타냈으나 유의성 있는 차이는 없었다 ( $p < 0.01$ ) (표 1-2, 그림 1-2).

## 2. 총단백질량 측정

다섯군의 세포를 배양 3일과 6일 8일에 총 단백질량을 측정 한 결과, 1군과 2군은 시간이 지남에 따라 증가하였고 3군과 4군은 3일에 비해 6일에 다소 감소하다가 8일에 다시 증가하였으며 5군은 6일까지 증가하다가 8일에 감소하였다(표 2, 그림 2).

표 2 Protein levels on mixed culture of rat periodontal ligament cell and calvaria cell

Group (cell mix ratio)	Protein (ug/ml)		
	3*	6*	8
1 (C10:P0)	13.06±0.30*	17.99±1.21*	20.86±1.31
2 (C7:P3)	12.98±1.14*	17.25±2.49*	29.40±2.14
3 (C5:P5)	11.72±0.42*	9.94±0.95*	18.88±1.55
4 (C3:P7)	9.58±0.47*	5.75±0.26*	7.84±0.49
5 (C0:P10)	3.16±0.91*	4.63±0.51*	4.60±0.24

Values are mean±S.E. , n=3.

\* : Statistically significant at  $P < 0.01$  by Duncan's Multiple Range Test.

C: Calvaria cell

P: Periodontal ligament cell

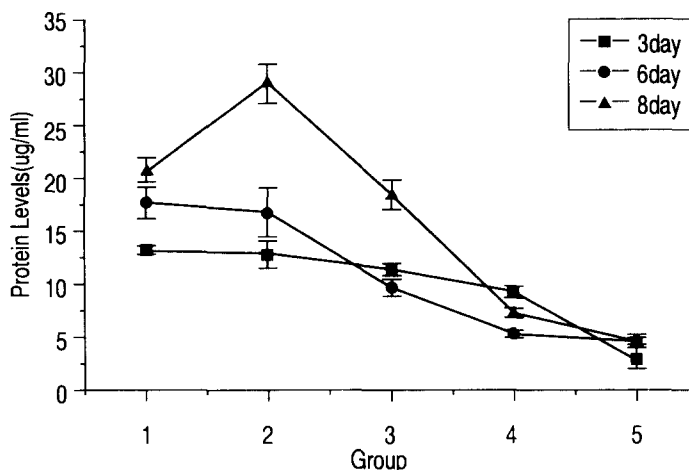


그림 2 Protein levels on mixed culture of rat periodontal ligament cell and calvaria cell

각군간의 총단백질량을 비교해보면 3일과 6일에는 1군에서 가장 많고 2군, 3군, 4군, 5군의 순서로 유의성있게 감소하였고 8일에는 2군에서 가장 많고 3군, 1군, 4군, 5군의 순서로 감소하였으나(p<0.01) 유의성있는 차이를 나타내지는 않았다(p<0.01).

각군간의 ALPase 활성도를 비교해보면 3일과 6일, 8일에 모두 1군에서 가장 높고 2군, 3군, 4군, 5군의 순서로유의성있게 감소하여 (p<0.01) 두개관세포의 비율이 증가할수록 ALPase 활성도가 높은 것으로 나타났다(표 3, 그림 3).

### 3. Alkaline phosphatase 활성도 측정

다섯군의 세포를 배양 3일과 6일, 8일에 ALPase 활성도를 측정한 결과, 모든군에서 시간이 지남에 따라 감소하는 양상을 보이며

### 4. 석회화 결절의 관찰

도립현미경하에서 각 군의 결절형성을 살펴 보면 배양 2일에 두개관세포만으로 구성된 1군에서 가장 먼저 결절로 추정되는 물질이

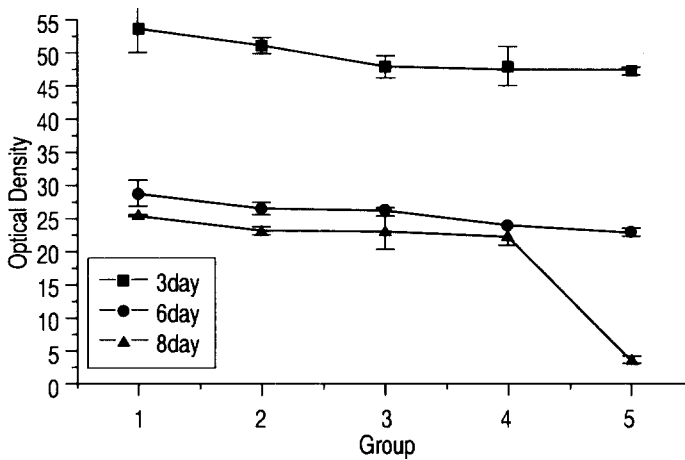


그림 3 Alkaline phosphatase activity on mixed culture of rat periodontal ligament cell and calvaria cell

표 3 Alkaline phosphatase activity on mixed culture of rat periodontal ligament cell and calvaria cell

Group(cell mix ratio)	Protein(ug/ml)		
	3*	6*	8
1(C10:P0)	54.29±3.19*	28.87±1.75*	25.56±0.10*
2(C7:P3)	51.89±1.04*	26.79±1.32*	23.56±0.57*
3(C5:P5)	48.56±2.18*	26.13±0.18*	23.29±2.02*
4(C3:P7)	48.12±3.29*	24.15±0.00*	22.97±1.32*
5(C0:P10)	48.07±0.57*	23.09±0.62*	3.64±0.57*

Values are mean±S.E., n=3.

\* : Statistically significant at P<0.01 by Duncan's Multiple Range Test.

C: Calvaria cell

P: Periodontal ligament cell



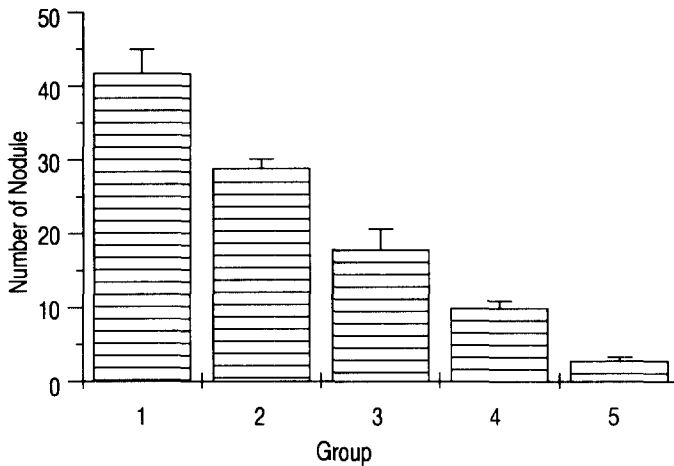


그림 4 Nodule formation on mixed culture of rat periodontal ligament cell and calvaria cell

표 4 Nodule formation on mixed culture of rat periodontal ligament cell and calvaria cell

Cell Number	Group(cell mix ratio)				
	1(C10:P0)	2(C7:P3)	3(C5:P5)	4(C3:P7)	5(C0:P10)
	42.00±3.20*	29.07±1.41*	18.00±2.75*	10.00±1.03*	2.67±0.45*

Values are mean±S.E. , n=3.

\* : Statistically significant at P<0.01 by Duncan's Multiple Range Test.

C: Calvaria cell

P: Periodontal ligament cell

관찰되었고, 이후 그 수가 증가하였으며 2군, 3군, 4군, 5군의 순서로 결절형성이 시작되었다. 배양 12일에 Alizarin red S 염색을 실시하여 석회화된 결절을 관찰하고 1.5×1.5mm<sup>2</sup>의 장방형의 격자내에 형성된 결절수를 비교한 결과 1군의 경우 42.00±3.20개로 가장 많았고 2군은 29.07±1.41개, 3군은 18.00±2.75개, 4군은 10.00±1.03개 5군은 2.67±0.45개로 두개관세포의 비율이 낮아질수록 유의성있게 결절수가 급격히 감소함을 나타냈다(p<0.01)(표 4, 그림 4).

#### IV. 총괄 및 고찰

치주조직 재생을 이루는 세포들의 기원과

분화양상, 그리고 상호간에 어떠한 영향을 미치며 작용하는지를 규명하는 것은 치주질환의 치유기전을 이해하고 보다 진보된 치료술식을 개발하는 데 있어서 매우 중요한 역할을 한다. Melcher등(1976)<sup>6)</sup>이 치주질환으로 인해 소실된 부착기구의 재생은 잔존치주인대에 존재하는 전구세포들이 치근면을 따라 치관쪽으로 이동하여 결합조직 부착을 재생시키고 신생백악질을 형성하는 일련의 세포분화과정으로 이루어진다는 가설을 발표한 이래로 치주인대 세포가 치주조직 재생에 있어서 중요한 역할을 한다는 것이 다양한 실험실 및 동물실험을 통해서 입증되었고 실제 임상에 적용되어 괄목할만한 성과를 올리고

있다. 그러나, 다양한 차폐막을 이용한 조직유도재생술식의 경우를 살펴보면 상피세포 및 치은 결합조직의 세포의 침투를 배제할 수는 있지만 치주인대뿐만 아니라 필연적으로 치조골 일부까지를 포함하여 차폐막이 적용되기 때문에 치조골재생을 이루는 세포가 치주인대에서만 기원한다고 볼 수는 없는 것이다. 따라서 치조골재생을 이루는 조골세포가 치주인대와 치조골 모두에서 기원하여 분화한다는 주장도 제기되고 있다. 최근에 Herr등(1995)<sup>16)</sup>은 개를 대상으로 치근이개부 수평결손을 형성하고 면역세포학적 방법을 이용하여 조직재생술식 후의 치유과정에 관여하는 전구세포의 기원과 역할에 대한 연구를 시행한 결과 초기 치유단계에서 조직재생을 위한 세포의 공급처가 잔존 치주인대와 기존 골조직 양자임을 밝혀냈다. 치주인대세포가 치주조직재생에 중요한 역할을 한다고 생각하는 이유는 치주인대세포가 갖는 이종성에 있으며 특히 조골세포와 유사한 특성을 가지고 있다는 것이 여러 실험실적 연구에서 밝혀졌다. Nojima등(1990)<sup>17)</sup>은 원숭이의 치주인대세포를 배양하여 실험한 결과 높은 ALPase 활성도를 보이고 부갑상선 호르몬에 대해서 cAMP의 증가를 나타내며 골관련 단백질을 생성하고 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>[1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]를 첨가했을 때 이러한 골관련 단백질의 형성이 증가함을 보임으로써 조골세포와 같은 특성을 지니고 있음을 입증했다. 그러나, 이러한 조골세포적 특징은 치주인대세포에서 만이 아니라 골조직으로부터 유래된 세포에서 더욱 전형적으로 나타난다. Robey등(1985)<sup>13)</sup>은 인간의 골조직에서 세포를 채취하여 배양한 실험에서 높은 ALPase 활성도 및 부갑상선호르몬에 대한 반응으로 cAMP의 생성이 증가하고 ascorbic acid와 Na- $\beta$ -glycerophosphate가 포함된 배지상에서 석회화 결절을 형성하며 제 1형 교원질만을 생성하고 osteonectin과 같은 골관련 단백질을

생성함을 보였다.

따라서, 본 연구에서는 치주조직재생에 관여한다고 여겨지는 치주인대세포와 골세포를 혼합배양하여 상호간에 미치는 영향에 대해 살펴보고자 하였다. 치주인대세포를 채취하기 위해 사용한  $\beta$ -aminoprpnitrile은 치주인대의 섬유아세포를 재배열시킴으로써 교원질의 인장강도를 감소시켜 치조골에 손상을 주지않고 쉽게 치아를 발거할 수 있게하는 약제로 치주인대를 효과적으로 발치와내에 잔존시킨다<sup>18, 19)</sup>. 이전에 Cho와 Garant등(1984)<sup>20, 21)</sup>이 행한 연구에 의하면  $\beta$ -aminoprpnitrile은 치주인대내의 세포배열에는 영향을 주지 않음이 입증되었기에 치주인대세포의 효과적인 채취를 위하여 많은 실험에서 사용되고 있다.

치주인대세포와 골세포를 단독 혹은 혼합배양했을때의 세포증식율을 살펴보면 표준배지에서의 경우 골세포 단독으로 배양한 1군이 가장 높은 세포증식율을 나타내며 치주인대세포만을 배양한 5군이 가장 낮은 세포증식율을 보였고 이들을 혼합배양했을때는 대체로 20일까지는 골세포의 비율이 증가할수록 세포증식율이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나, 이러한 양상이 전적으로 이 두가지 세포의 상대적인 증식속도의 차이에 기인하는 것인지 아니면 이들을 혼합배양한 경우 골세포가 치주인대세포의 증식을 직접적으로 억제하는 기전이 작용하는 것인지는 알 수 없었다.

Ascorbic acid, Na- $\beta$ -glycerophosphate, dexamethason이 포함된 조건배지에서의 세포증식율이 표준배지에서 배양한 경우보다 저하됨을 나타내는것은 결절형성에 따른 세포수의 감소와 함께 아마도 dexamethason의 영향때문이라고 생각된다. Dexamethason을 포함한 glucocorticoid는 세포의 증식과 제 1형 교원질 및 osteocalcin 합성에 있어서 억제와 촉진의 상반된 효과를 나타낸다고 알려져 있으며 이는 세포의 종과 분화정도 및

glucocorticoid 의 농도에 따라서 다르게 나타나는 것 같다<sup>11, 22)</sup>. 이외에 ascorbic acid 는 교원질 합성과 결절형성 및 석회화에 필수적인 요소로서 실험실상에서 ALPase 활성도와 단백질 합성에 있어서도 영향을 주는 것으로 알려져있으며 Na-β-glycerophosphate 는 석회화 결절형성에 필요한 인산이온을 공급하는 역할을 하고 실험실상에서 기질의 석회화를 촉진시키는 것은 확실하지만 생체내에서도 조골세포에 의한 골형성을 촉진하는지는 밝혀지지 않았다<sup>11, 22)</sup>.

총단백질량은 3일과 6일의 경우 골세포의 비율이 증가할수록 더 많은 단백질량을 나타냈으며 8일의 경우 2군에서 가장 많고 3군 1군 4군 5군의 순서로 감소함을 나타냈다. 이는 설정한 세포수가 다르다는 점을 감안했을 때 앞서 시행한 조건 배지에서 세포증식율을 측정된 결과와 대체로 일치한다고 볼 수 있다. 따라서, 세포가 증식함에 따라 총단백질량도 증가하며 골세포가 치주인대세포보다 상대적으로 빠른 증식속도를 나타내기 위해 같은 양상을 보인다고 생각할 수 있지만 세포의 종류에 따라 DNA/Protein의 비율이 다르다는 점<sup>23)</sup>을 고려해야 할 것이다.

ALPase 활성도는 모든군에서 시간이 지남에 따라 감소하였고 골세포의 비율이 적어질수록 감소하는 양상을 나타냈는데 이는 골세포가 치주인대세포보다 높은 ALPase 활성도를 나타내며 상대적으로 빠른 증식율을 보이기 때문인 것으로 생각할 수 있다. ALPase 는 기질세포에 의해 유도되는 석회화 과정에서 중요한 역할을 수행하는 효소로 알려져있으며 칼슘이온이 침착되어 석회화 과정이 개시되면 활성도가 현저히 감소하는 것<sup>18, 23)</sup>으로 보고되고 있기에 시간이 지남에 따라 그 활성도가 저하되는 것으로 생각된다. 석회화 기간동안에 ALPase 활성도가 감소되는 이유는 아직까지 명확히 규명되지는 않았으나 ALPase 활성에 필수적인  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  같

은 금속이온이 석회화 기간중에 소실되기 때문이라는 가설이 신빙성 있게 받아들여지고 있는데 이는 기질세포에  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ 을 첨가하면 다시 활성도가 증가한다는 사실로도 확인할 수 있다<sup>18)</sup>.

석회화 결절의 형성은 모든군에서 나타나지만 골세포의 비율이 적어질수록 결절형성시기가 지연되며 그 수도 감소하는 것으로 보아 골세포와 치주인대세포 모두가 실험실상에서 배지의 조건에 따라 석회화 결절을 형성할 수 있지만 혼합배양시에는 치주인대세포가 골세포의 석회화 결절형성 능력을 억제하는 것으로 생각된다. 이러한 억제기전이 치주인대세포가 골세포의 ALPase 활성도를 직접적으로 억제하여 나타나는 것인지 혹은, 치주인대세포가 다른 용해성 억제물질을 생산하는 것인지는 밝혀지지 않았으나, Ogiso 등(1991)<sup>24)</sup>의 연구에 의하면 치주인대세포 및 치은섬유아세포의 유리물질이 녹아있는 배양액에 일정기간 골수세포를 배양했을 때 치주인대세포와 치은섬유아세포 모두가 골수세포의 석회화결절 형성 능력을 억제함을 알 수 있었다. 또한, 이러한 억제현상은 섬유아세포에서 현저하며 Indomethacin이 존재할때에는 영향을 미치지않는 것으로 보아 아마도 섬유아세포가 prostaglandin 등과 같은 용해물질을 분비하여 조골세포의 분화와 기능을 억제하는 것 같다고 추정하였다.

이번 실험에서는 형성된 석회화 물질이 골세포와 치주인대세포의 비율과 무관하게 동일한 구성과 구조를 갖는 물질인지, 또한 과연 이것이 골조직인지를 밝혀내는 검사를 시행하지는 않았지만 앞에서 살펴본 이전의 연구들에 따르면 치주인대세포에 의해 형성된 석회화 결절의 경우 골조직이라는 주장과 무세포성 백악질이라는 주장이 모두 제기되고 있다. 그러므로, 골세포와 치주인대세포에 의해 형성된 석회화 결절의 구성성분과 존재를 규명하는 것이 경조직 재생에서의 이틀

세포의 역할을 알 수 있는 중요한 단서를 제공할 것으로 생각된다.

본실험을 통해 골세포와 치주인대세포 모두가 경조직 형성에 관여할 수 있으나 골세포가 치주인대세포에 비해 상대적으로 높은 경조직 형성능력을 가지고 있음을 실험실적 연구로 입증하였고 혼합배양시 두세포간의 상호작용을 살펴보았다. 그러나 생체내의 치주조직은 보다 다양한 세포들이 존재하고 실험실상의 조건과는 많은 차이가 있기 때문에 경조직 재생에 있어서의 골세포와 치주인대세포의 명확한 역할을 알기 위해서는 보다 진전된 연구가 필요하며 무엇보다도 생체내에 적용할 수 있는 조골세포에 대한 표지를 발견하는 것이 시급한 과제라고 생각된다.

## V. 결론

치주조직 재생에 관여하는 골세포와 치주인대세포의 상호작용을 알아보기 위해 백서의 두개관세포와 치주인대세포를 10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 그리고 0:10의 비율로 혼합배양하고 이를 각각 1, 2, 3, 4, 5군으로 분류하였다. 계획한 예정일대로 배양한 세포는 세포증식율, 총단백질량, Alkaline Phosphatase 활성도를 측정하고 석회화 결절의 형성을 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 표준배지에서의 세포증식율은 7일과 20일에서 골세포의 비율이 감소할수록 유의성있게 저하되었다( $p<0.01$ ).
2. 조건배지에서의 세포증식율은 3일과 14일에서 골세포의 비율이 감소할수록 유의성있게 저하되었다( $p<0.01$ ).
3. 총단백질량은 3일과 6일에서 골세포의 비율이 감소할수록 유의성있게 저하되었다( $p<0.01$ ).
4. ALPase 활성도는 모든 실험군에서 시간이 지날수록, 또한 골세포의 비율이 감소

할수록 유의성있게 저하되었다( $p<0.01$ ).

5. 석회화 결절의 형성은 배양 2일에 1군에서 가장 먼저 관찰되었으며, 석회화 결절의 수는 골세포의 비율이 감소할수록 유의성있게 저하되었다( $p<0.01$ ).

이상의 연구결과로부터 골세포와 치주인대세포의 혼합배양시에 세포증식율과 총단백질량 및 ALPase 활성도에 있어서 주로 골세포의 절대량에 의해 영향을 받는 것으로 추정할 수 있다.

또한, 석회화 결절은 배지의 조건에 따라서 골세포와 치주인대세포 양자가 모두 형성할 수 있으며 이들을 혼합배양했을때는 골세포의 석회화 결절 형성능력이 억제됨을 알 수 있었다.

## VI. 참고문헌

1. Gould, T. R. L., Melcher, A. H., and Brunette, D. M. : Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat. Rec.*, 188: 133-142, 1977.
2. 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.
3. McCulloch, C. A. G., and Melcher, A. H. : Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am. J. Anat.*, 167: 43-58, 1983a.
4. McCulloch, C. A. G., and Melcher, A. H. : Cell migration in the periodontal ligament of mice. *J. Periodont. Res.*, 18: 339-352, 1983b.
5. McCulloch, C. A. G., Nemeth, E., Lowenberg, B., and Melcher, A. H. :

- Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat. Rec.*, 219: 234-242, 1987.
6. Melcher, A. H. : On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, 47:256-260, 1976.
  7. Nyman, S., Gottlow, J., Karing, T., and Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament. *J. Clin. Periodont.*, 9: 257-265, 1982.
  8. 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.
  9. Cho, M. I., Matsuda, N., Lin, W. L., Moshier, A., and Ramakrishnan, P. R. : In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif. Tissue Int.* 50: 459-467, 1992.
  10. Mukai, M., Yoshimine, Y., Akamine, A., and Maeda, K. : Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. *Cell. Tissue Res.*, 271: 453-460, 1993.
  11. 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 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.
  12. Gotoh, Y., Hiraiwa, K., and Nagayama, M. : In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Bone and Mineral.*, 8: 239-250, 1990.
  13. Robey, P.G., and Termine, J. D. : Human cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.*, 37 : 453-460, 1985
  14. Melcher, A. H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E., and Shiga, A. : Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone: a light and electron microscope study. *J. Periodont. Res.*, 21: 592-612, 1986.
  15. 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
  16. Herr, Y., Matsuura, M., Lin, W. L., and Genco, R.J. : The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defect healing in the beagle dog. *J. Periodontol.*, 66: 716-730, 1995
  17. Nojima, N., Kobayashi, M., Shionome, M., Takahashi, N., Suda, T, and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J. Periodont. Res.*, 23: 179-185, 1990.
  18. Bornstein, P. : The cross - linking of collagen and elastin and its inhibition in osteoarthritis. *Am. J. Med.*, 49 : 429-432, 1970.
  19. Fry, P. M., Harkness, M. L. R., Harkness, R.D., and Nittingale, M. : Mechanical properties of tissue lathyrictic animals. *J. Physiol.*, 164 : 77-89, 1962.

20. Cho, M. I., and Garant, P. R. : The effect of beta- aminopropionitrile on the periodontal ligament : I. Ultrastructure of fibroblasts and matrix. *J. Periodont. Res.*, 19 : 247-260, 1984.
21. Cho, M. I., and Garant, P. R. : The effect of beta- aminopropionitrile on the periodontal ligament : II. Radiographic study of collagen secretion from fibroblast. *Anat. Rec.*, 209 : 41-52, 1984.
22. Beresford, J. N., Graves, S. E., and Smoothy, C. A. : Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: A model of bone formation? *Am. J. Medical Genetics*, 45: 163-178, 1993.
23. Nijweide, P.J., van der Plas, A., and Scherft, J. P. : Biochemical and histological studies on various bone cell preparation. *Calcif. Tissue. Int.*, 33 : 529-540, 1981
24. Ogiso, B., Hughes, F. J., Melcher, A. H., and McCulloch, C. A. G. : Fibroblasts inhibit mineralized bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 146: 442-450, 1991.
25. McCulloch, C.A.G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat. Rec.*, 211: 258-262, 1985.
26. Benayahu, D., Kletter, Y., Zipori, D., and Wientroub, S. : Bone marrow - derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype in vitro and osteogenic capacity in vivo. *J. Cell. Physiol.*, 140 : 1-7, 1989
27. Melcher, A. H., McCulloch, C. A. G., Cheong, T., Nemeth, E., and Shiga, A. : Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. *J. Periodont. Res.*, 22: 246-247, 1987.
28. Beresford, J. N. : Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clinic. Orthop.*, 240 : 270-280, 1989.
29. Leboy, P.S. Beresford, J.N., Devin, C., and Owen, M. E. : Dexamethasone induction of osteoblast mRNA in rat marrow stromal cell in culture. *J. Cell. Physiol.*, 146 : 370-378, 1991.
30. Bellows, C.G, and Aubin, J. E. : Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev. Biol.*, 133 : 8-13, 1989
31. McCulloch, C.A.G., and Bordin, S. : Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J. Periodont. Res.*, 26: 144-154, 1991.
32. Kasuai, S., Nagata, T., and Sodek, J. : Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and sparc protein during bone formation in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 152 : 467-477, 1992.
33. Wergerdal, J.E., and Baylink, D.J. : Characterization of cells isolated and cultured from human bone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 170 : 60-69, 1984.
34. Ramakrishnan, P. R., Lin, W. L., Sodek, J., and Cho, M. I. : Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif. Tissue. Int.*, 57: 52-59, 1995.

35. Kasugai, S., Todescan, R., Nagata, T., Yao, K.L., Butler, W.T., and Sodek, J. : Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro : Inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J. Cell. Physiol.*, 147 : 111-120, 1991.
36. Tenenbaum, H. C., and Heersche, J. N. M. : Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif. Tissue Int.*, 34: 76-79, 1982.
37. Bellow, C. G., Aubin, J. E., Heersche, J. N. M., and Antosz, M. E. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.*, 38: 143-154, 1986.
38. Simmons, D.J., Kent, G. N., Jilka, R.L., Scott, D. M., Fallon, M., and Cohn, D.V. : Formation of bone by isolated, cultured osteoblasts in millipore diffusion chambers. *Calcif. Tissue Int.*, 34 : 291-294, 1982.
39. Maniatopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A. H. : Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell. Tissue Res.*, 254: 317-329, 1988.
40. Charrier, B.E., Glorieux, F.H., Rest, M., and Pereira, G. : Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J. Cell. Biol.*, 96 : 639-643, 1983.
41. Somerman, M. J., Young, M. F., Foster, R. F., Moehring, J. M., Imm, G., and Sauk, J. J. : Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archs. Oral Biol.*, 35: 241-247, 1990.
42. Williams, P.C., Boder, G.B., Toomey, R. E., Paul, D. C., Hillman, Jr., C. C., King, K. L., Van Frank, R. M., and Johnston, C. : Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcif. Tissue Int.*, 30 : 233-246, 1980.
43. Howard, C., Tenenbaum, and Johan, N. M., Heersche. : Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology.*, 30 ; 233-246, 1980.
44. Groenneveld, M. C, Everts, V., and Beertsen, W. : Formation of afibrillar cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained in vitro. *J. Dent. Res.*, 73 (10) : 1588-1592, 1994.
45. Yamashita, Y., Sato, M., and Noguchi, T. : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Archs. Oral Biol.*, 32: 677-678, 1987.

## **The effects of mixed culture of rat periodontal ligament cells and calvaria cells on the calcification**

Ji-Sook Kim, Joon-Bong Park, Man-Sup Lee, Young-Hyuk Kwon, Yeek Herr, Sang-Cheol Lim  
Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung-Hee University

This study was performed to evaluate the effect of mixed culture of rat's calvaria cells and periodontal ligament cells on calcification. These cells have been known to do important role on the periodontal tissue regeneration, especially alveolar bone and cementum.

Experimental groups were made which based on the different rate of rat's calvaria cells and periodontal ligament cells, and then these cells were cultured with Dulbecco's Modified Eagle's Medium contained with 10% fetal bovine serum, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid, and 10mM/ ml Na- $\beta$ -glycerophosphate. Each group was characterized by examining the cell proliferation rate, amount of total protein synthesis, alkaline phosphatase activity, and the number of calcified nodules in vitro. In cell proliferation rate, the cells of control groups were cultured Dulbecco's Modified Eagle's Medium contained with 10 % fetal bovine serum.

The results were as follows :

1. The cell proliferation rate in control groups decreased stastically significantly along with the decrease of the rate of bone cells at 7 day and 20 day( $P < 0.01$ ).
2. The cell proliferation rate in experimental groups decreased stastically significantly along with decrease of the rate of bone cells at 3 day and 14 day( $P < 0.01$ ).
3. The amount of total protein synthesis was significantly decreased along with decrease of the rate of bone cells at 3 day and 6 day( $P < 0.01$ ).
4. Alkaline phosphatase activity showed reverse time dependent pattern and was significantly decreased along with decrease of the rate of bone cells during the experimental periods ( $P < 0.01$ ).
5. Calcified nodules were observed in group 1 (Rat calvaria cells alone) for the first time, and the number of calcified nodule decreased stastically significantly along with the decrease of the rate of bone cells at 12 day( $P < 0.01$ ).

From the above results, When bone cells and periodontal ligament cells were mixed cultured, the cell proliferation rate was mostly dependent on the actual rate of bone cells and same pattern was showed in amount of total protein synthesis, alkalinephosphatase activity, and the number of



calcified nodules. And the calcified nodule forming capacity of bone cells was inhibited by periodontal ligament cells