

전기적 자극이 배양 두개관 골세포의 석회화에 미치는 영향에 관한 연구

박준봉¹ · 허인식¹ · 이해자¹ · 최영철²

경희대학교 치과대학¹ 치주과학교실, ²소아치과학교실

I. 서론

수세기 동안 많은 석학들이 골형성 기전을 정확히 규명하려고 노력해 왔다. 그러나 골 성장에는 수많은 복잡한 요인들이 상호작용하고 있기 때문에 아직도 골형성기전의 많은 부분을 밝히지 못하고 있다.

치주조직은 치은, 치조골, 백악질 및 치주인대로 구성되어 있다. 이 중 백악질과 치조골 사이에 존재하며, 치밀한 결체조직으로 이루어져 있는 치주인대는 치아를 경조직인 치조골에 연결시켜주며 치아를 고유한 위치에 유지할 수 있게 해주는 중요한 역할을 수행한다. 이러한 치주조직은 형태학적으로 다양한 구조를 갖는 세포들의 집합체로 구성되어 있다. 따라서 치주조직을 구성하고 있는 요소들의 다양성은 소실된 치주조직을 재생시키기 위한 환경설정에 많은 어려움을 야기한다.

치주치료의 궁극적인 목적은 소실된 치주조직을 정상적인 구조와 기능을 갖는 조직으로 재생시켜 주는 것이다. 지난 수십년 동안 치주조직의 재생을 도모하기 위해 아래와 같은 5가지 방법을 주로 사용하였다. 첫째, 구연산

이나 테트라사이클린 혹은 Fibronectin과 같은 치근면 처리제(Terranova등, Caffesse등)¹⁻²를 사용하여 세포가 치근면에 보다 쉽게 부착하고 이동할 수 있게 해주는 방법, 둘째, 선택적인 세포증식을 유도하기 위해 Teflon(Gottlow등)³이나 콜라겐(Blumenthal등)⁴ 혹은 poly-lactic acid membrane(Magnusson등)⁵과 같은 조직유도재생 재료를 이용하는 방법, 셋째, 재료 자체로는 생물학적인 물성을 가지지 않지만 신생골 성장에 비계역할을 하는 Hydroxyapatite나 β -Tricalcium phosphate등의 비생활성 골전도물질(박 등, Froum등)⁶⁻⁷을 골이식체로 사용하는 방법, 넷째, 치관변위판막술(Gantes등)⁸과 같은 임상적인 술식을 사용해서 치주조직의 재생을 유도하는 방법, 다섯째, 탈회동결건조골이나 골혼화 및 골수 등과 같이 숙주의 결체조직 혹은 골세포를 자극하여 골형성을 유도하거나, 생활성 골형성 세포를 제공하는 골유도물질 혹은 골원성 물질(Garrets등)⁹등을 사용하는 방법들을 이제 까지 사용해 왔다.

그러나 Polypeptide growth factor가 치주조직의 재생에 많은 도움을 줄 수 있다는 연구들이

*이 논문의 일부는 1995학년도 경희대학교 교비지원 연구과제비로 이루어졌음

최근에 발표되었다(Lynch 등, 조 등)¹⁰⁻¹¹⁾.

치주질환으로 인해 소실된 치조골을 처치하기 위해 골절제-골정형술, 골의 생화학적 처치술, 신생골이 형성될 수 있는 환경을 만들어주기 위한 골천공술, 골이식술 등의 방법들을 사용하였다. 일반적으로 골치료방법을 선택할 때, 치조골은 충분히 재생될 수 있지만, 경우에 따라서는 치조골의 재생이 극히 어려울 수도 있다는 사실을 알아야 한다. 따라서 치조골결손의 형태, 정도, 잔존치의 상태, 동요도, 환자의 연령, 협조도등의 인자를 종합적으로 해석하여 골절제술-골정형술의 방향으로 치료할 것인지, 골재생술의 방향으로 치료할 것인지를 결정해야 한다. 골절제수술은 어디까지나 골재생이 어려울 때 시행하는 술식으로, 치태조절을 쉽게할 수 있는 치조골과 치은의 형태를 만들어 주는 것을 목적으로 한다. 또 골면을 적극적으로 처치하지 않고 감염된 치근표면에 대한 처치를 주로 시행하는 술식은 언젠가 치조골의 재생을 유도한다는 생각에 근거한다. 그러나 최근 치주치료학의 방향은 치조골을 제거하는 골절제형 치료로부터 골재생형 치료로 바뀌어 가고 있다. 그럼에도 불구하고 아직 조골작용을 하는 조골세포의 석회화기전을 완전히 밝혀지지는 못하고 있다.

세포생물학 분야의 발전으로 인해 가능해진 단위세포의 배양과 Cloning 방법의 출현은 세포의 화학적, 물리학적 분석법, 세포주기의 분석법, 동조배양법 등의 발전으로 이어졌다. 세포배양법은 인간조직의 실험을 가능하게 했다는 중요한 의미를 갖는다. 이로인해 과거에는 할 수 없었던 분야의 연구를 할 수 있게 되었다. 특히 세포융합기술은 2 종 세포의 잡종세포(Hybrid)를 만들 수 있게 했고, 염색체 지도라든가 유전자 발현기전의 해석, Hybridoma 형성에 이용할 수 있게 했다. 최근 유전자도입기술(Transfection)은 유전자의 동정, 그 기능의 해석, 유전자 발현기전 등을

설명하기 위해 분자유전학의 중요한 연구 수단으로 사용되고 있다.

골형성시 관여하는 요인은 유전적 영향과 기능적 요인으로 대별할 수 있다. 전자는 골형성 세포활동을 직접 조절하거나 세포의 미세환경을 간접변화시킴으로서 영향을 줄 수 있다. 유전적 요인은 어떤 세포의 활동에 직접적인 영향을 줄 수 있다. 생물학적 현상이 환경적 요인 만으로 일어날 수 없는 것과 마찬가지로, 환경적 요인의 영향을 벗어나서는 생물학적 현상이 일어날 수 없다. 이러한 환경적, 국소적 요인중 골에 가해지는 기계적 응력을 통해 골조직의 교원결정체 변형을 야기하고 생물학적으로 전기적인 변화를 유발하는 Piezo factor는 골아세포 또는 파골세포의 반응을 직접, 간접적으로 유도하므로 골을 재형성(bone remodeling) 시킨다.

본 연구의 궁극적인 목적은 우선 전기적 자극기의 개발을 위한 기본적 지식을 함양하여 in vitro 상에서 증식분화된 두개관세포, 골수세포등을 대상으로 전기적 자극이 석회화 과정에 미치는 기전을 규명한 후 소실된 골조직을 재생하기 위해 현재까지 임상에 응용하고 있는 방법외에 새로운 치료방법을 도입할 수 있는 기기개발을 그 목적으로 한다.

II. 연구방법

1. 연구재료

(1) 백서 두개관세포 배양

골의 생성반응 연구에 가장 일반적으로 사용하는 백서 두개관세포(Rat Calvaria Cell)를 배양하기 위해서 무게 100g전후의 백서를 Pentobarbital Sodium(Tokyo Industrial Chem., Japan)으로 복강마취한 후 70%알콜로 두피를 세척 소독하고 두경부를 탈락하여 희생하였다. 외과용 가위로 하악을 상악골에서 분리하고 두피를 박리한 후 두개관을 분리하였고

연조직을 완전히 제거한 다음 세척하여 200U/ml penicillin(Gibco, USA)과 200 μ g/ml streptomycin(Gibco, USA)이 첨가된 Dullbeco's Minimum Essential Medium (DMEM, Gibco, USA)에 5회 세척하였다. 35mm 세포 배양접시에 고르게 분산시킨 후 초기배양액인 20% Fetal Bovine Serum(FBS)와 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Gibco, USA)이 포함된 DMEM을 넣고 37 $^{\circ}$ C, 습도 100%, 5% CO₂ 공기혼합배양기 (Vision, Korea)에서 배양하였다. 2세대가 경과한 후 계대배양액인 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM으로 3일 간격으로 배양액을 교환하면서 밀생될 때까지 배양했다.

(2) 세포배양의 조건

조직배양에 사용된 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, U.S.A. 이하 DMEM으로 표기)으로 용액내에 200unit/ml penicillin 과 200 μ g/ml streptomycin (Gibco, U.S.A.), 1 μ g/ml amphotericin-B (Gibco, U.S.A.)를 첨가하였으며, 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.)를 혼합하였고, 배양조건이 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂인 공기혼합 배양기(Vision Scientific Co., 한국)에서 배양하였다.

(3) 세포의 저장

100mm 배양접시에 배양된 세포를 박리하여 1500rpm으로 5분간 원심분리한 후 10% DMSO 가 함유된 0.5ml의 배양액으로 현탁액을 만들었다. Polypropylene freezing vials에 균등분배하여 30분간 얼음위에 방치하였고, -20 $^{\circ}$ C 냉동실에서 1시간 예비냉동한 후 -70 $^{\circ}$ C Deep freezer에서 24 시간 보관했다가 liquid nitrogen tank에 보관하였다. 보관된 세포는 48 시간후 녹여 회생율검사를 시행하였고 실험이 진행될 때까지 계속 보관하였다.

2. 전기자극기의 적용

각 Well에 맞도록 배양접시 뚜껑에 전극을 2개씩 걸고 전선을 각각 연결하여 전류가 흐르도록 만든 6well 배양접시에 5 \times 10⁴ cells/cm²개의 세포를 분주하고 실험군에는 분주 후 바로 Acutron multiwave 911기기 (Microcurrent Research, INC., U.S.A.)를 사용하여 30 Hz로 10uA, 30uA, 50uA의 저주파 자극을 가하기 시작하여 12시간동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포증식을 위해서 12시간 저주파 자극을 받은 세포를 60시간 동안 더 배양하였다.

3. 분석방법

(1) 세포증식률 측정

0.05% trypsin EDTA를 5분간 세포에 처리하여 박리하고 세포를 완벽하게 박리하기 위해 DMEM으로 잔여 세포를 분리한 후 hemacytometer로 세포수를 측정하였다. 저주파 자극을 가하지 않은 대조군과 12시간동안 저주파 자극을 가한 실험군을 비교하였다.

(2) 단백질 정량

Bradford의 방법을 사용하여 각 well의 단백질 총량을 정량하였다. 0.1 M phosphate buffered saline(PBS) 500 μ l를 세포 침전에 가하여 교반한 후 세포가 들어 있는 시험관을 얼음에 고정시키고 초음파 분쇄기(Sonic dismembrator, Fisher Scientific, U.S.A.)로 30초간 분쇄하였다. 시료 100 μ l를 취하여 시험관에 옮기고 Bio-Rad Protein assay 시약(4:15 용액)을 5ml 넣고 반응시켜 10분간 방치한 후 590nm(UV-VIS spectrophotometer, Shimadzu, U.S.A.)에서 흡광도를 측정하였다. 590nm에서의 흡광도는 bovine serum albumin을 이용해서 그린 표준곡선과 비교하여 단백질을 정량하였다.

(3) Alkaline phosphatase 활성도 측정

Alkaline phosphatase 활성도는 p-nitrophenyl phosphate이 p-nitrophenol로 환원되는 정도를 측정하여 평가하였다. 앞에서 초음파 분쇄한 시료 50μl에 37°C 수조에서 3분간 가온한 2ml의 기질(영동제약, 한국)을 첨가하여 교반한 후, 37°C 수조에서 정확하게 15분간 반응시켰다. 여기에 2ml의 발색액을 넣고 10분이상 방치한 후 500nm에서 흡광도를 읽어 p-nitrophenol 표준 흡광도 곡선에 대비시켜 활성도를 측정한다.

(4) 통계분석

모든 실험에서 sample 수를 6개씩 준비하고 두번 실험하였으므로 N=12이고, 분산분석에 따른 대조군과 실험군 사이의 유의적인 차이를 알아보기 위해 Student-Newman-Keuls test를 실시했다. P<0.05 일 때를 유의적인 것으로 간주했다.

III. 연구성적

1. 예비 실험 결과

Acutron multiwave 911기기에서 세포의 저주파자극에 대한 최적 전류의 세기와 최적 시간을 결정하기 위하여, 10uA, 30uA, 50uA에서 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 저주파 자극을 가하였고 3시간마다 세포의 상태를 위상차 현미경하에서 관찰하였다. 10uA보다 강한 전류를 흘려 보냈을 때와 12시간이 넘게 저주파 자극을 가했을 때는 세포들이 괴사를 일으켰다. 또한, 10uA에서 12시간 저주파 자극을 가했을 때에는 정상이던 세포도 12시간동안 더 배양하면 괴사를 일으켰기 때문에, 10uA에서 12시간 저주파자극을 가한 후 배지를 교환하여 60시간 더 배양하도록 최종 결정하였다.

2. 두개관세포의 증식에 대한 저주파 자극의 영향

5×10⁴cells/cm²(3.14×10⁴cells/ml)의 세포밀도로 6well 배양접시에 세포를 분주하여 대조군과 실험군에서 3일간 배양한 두개관세포의 증식 결과를 표 1과 그림 1에 나타내었다. 3일간 배양한 두개관세포의 밀도는 대조군이 28.69±0.188(×10⁴ cells/ml)였고 실험군이 26.31±0.473(×10⁴ cells/ml)였다. 따라서, 10uA의 저주파 자극은 통계적으로 유의성 있게(p<0.05) 세포증식을 8.3%가량 감소시켰다.

표 1 Effect of Electric Current on the Proliferation of Rat Calvaria Cell

Group	Number of Cells(×10 ⁴ cell/ml)
control	28.69±0.188
10 uA	26.31±0.473

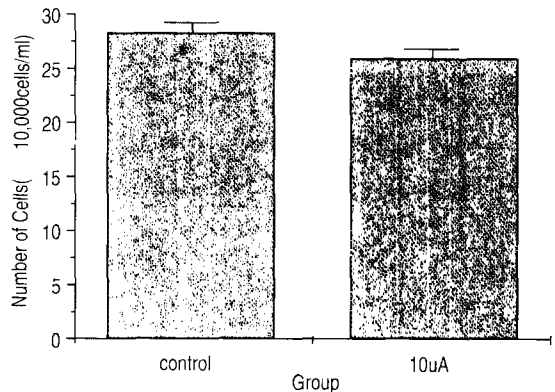


그림 1 Effect of electric current on the proliferation of rat calvaria cell

3. 두개관 세포의 단백질 합성능에 대한 저주파 자극의 영향

12시간동안 저주파 자극을 가하고 60시간 더 배양한 두개관세포의 단백질량을 Bradford

표 2 Effect of Electric Current on Protein Level in Rat Calvaria Cell

Group	Protein level(ug/ml)
control	31.6±1.145
10uA	24.3±1.798

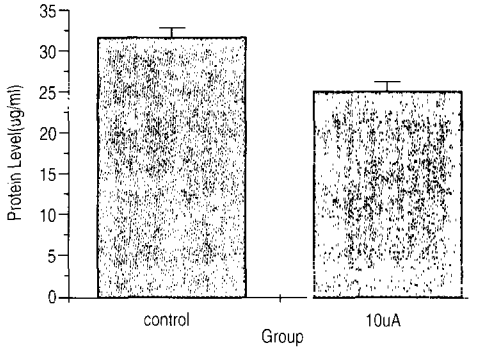


그림 2 Effect of electric current on the protein level in rat calvaria cell

방법을 사용하여 측정하였고 그 결과를 표 2와 그림 2에 나타내었다. 저주파 자극을 가하지 않은 대조군의 단백질량은 31.6 ± 1.145 (ug/ml)이었고 10uA의 저주파 자극을 가한 실험군의 단백질량은, 대조군보다 유의성 있게 ($p < 0.01$) 적은 24.3 ± 1.798 (ug/ml)이었다.

4. Alkaline phosphatase 활성도에 대한 저주파 자극의 영향

10uA의 저주파 자극이 두개관세포의 alkaline phosphatase 활성에 미치는 영향을 표 3과 그림 3에서 살펴보면, 대조군은 0.785 ± 0.066 (IU)인데 12시간의 저주파 자극을 받은 실험군의 ALP활성도는 1.991 ± 0.015 (IU)로 눈에 띄게 유의성 있는 차이를 보이면서 ($p < 0.001$) 증가하였다. 이는 저주파 자극이 두개관 세포의 증식율과 단백질 합성능에서 보인 결과와는 상이하게 다르다. 따라서, 저주파

표 3 Effect of Electric Current on Alkaline Phosphatase Activity Level in Rat Calvaria Cell

Group	ALP activity(IU)
control	0.785±0.066
10uA	1.991±0.015

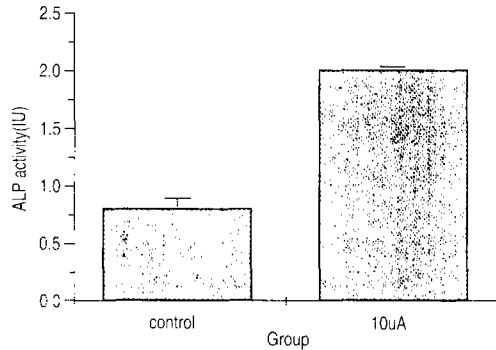


그림 3 Effect of electric current on the alkaline phosphatase activity in rat calvaria cell

자극이 골형성을 돕는 기전은 골세포 증식을 자극하여 일어나는 것이 아니라 골세포 분화 상태의 변화에 의한 것임을 알 수 있다.

IV. 총괄 및 고찰

Alkaline phosphatase 활성에 대한 이 연구는 백서의 osteosarcoma cell line(ROS 17/2.8)에서 전류가 세포 밀도에 의존해서 골세포 기능을 조절한다는 Kenneth J. McLeod¹²⁾ 등의 보고와 일치한다. 또한, 밀도가 높은 세포 분포에서 alkaline phosphatase 활성이 높다는 이 연구결과는 estradiol(Gray 등)¹³⁾, 1,23-dihydroxyvitamin D3(Grigoriadia 등)¹⁴⁾, thyroid hormones(Sato 등)¹⁵⁾을 처리했을 때의 효과와 동일하다.

인간의 생명력 유지에 electricity가 가장 기본적인 요소라는 "Animal Electricity" 개념은 18세기 Galvani에 의해 제창된 이후 많은 이론의 발전을 이루었으며, 그 후 많은 학자들이

생체에서의 전기적 활동을 임상에 응용할수 있는 방법을 연구하여 왔다. 지난 30여년간 전류, 또 최근에는 전자기장을 이용하여 동물 실험에서, 또는 인간에서 골성장을 촉진시키기 위한 연구들이 진행되어 왔다. Mathew 등¹⁶⁾은 히드로충 (hydroid)에서 전기적 극성과 자연 발생적인 정전기 현상이 있다는것을 발견하였고 그후 Lund 등¹⁷⁾은 동물실험을 통해 전류의 적용으로 극성을 조절하여 원시적 형태의 다리 재생이 가능하다는 것을 밝혀냈다. Yasuda 등¹⁸⁾은 생체의 골에 압박이나 전류를 가하면 골이 형성되는 것을 관찰하였고 Bassett 등¹⁹⁾, Brighton 등²⁰⁾, Friedenberg 등²¹⁾, Shamos 등²²⁾은 생리적, 또는 병리적 상태에서 골조직이 내포하고 있는 전기적 성질과 골대사나 골형성이 상호관계를 나타낸다고 보고하였다.

Fukada와 Yasuda²³⁾, Shamos와 Lavine²²⁾, Shima²⁴⁾ 등은 일종의 crystal에서 발견된 고전적 Piezo electricity와 유사한 전기적 효과를 골에서 발견하였으며, McElhaney²⁵⁾는 인간의 대퇴골에 발생하는 전하분포를 발견하였다. Bassett와 Becker²⁶⁾는 골은 극히 미약한 변형에도 반응하는 매우 민감한 piezoelectric gauge와 같아서 골성장이 전기적 조절에 의해 이루어진다고 하였으며 John²⁷⁾은 생체내에서 자연적으로 발생하는 SGP와 유사한 크기와 빈도의 전류가 골성장을 증가 시킬수 있다고 하였다. 그 후 Bassett²⁸⁾은 만약 생체내에서 기계적 에너지가 전기적 에너지로 전환될수 있다면 그 효과가 광범위할 수 있다고 하였으며, Becker, Harrington 등²⁹⁾은 이와같은 전기적 변화가 일반적 조직치유와 연관된 세포 변화를 일으킬 수 있다고 하였다.

전류는 직접 또는 간접으로 작용할수 있고 교류(alternative current)보다는 직류전기(direct current)가 효과적이라는 것이 일반적인 견해이며 Norton³⁰⁾에 의하면 전기적 에너지는 unidirectional signal이 효과적이며 그렇

지 않은 경우에는 골형성과 흡수가 함께 나타날 수도 있다고 하였다. Becker와 Murray³¹⁾는 전기적 자극에는 세포 활동을 개시시키는 역치가 존재한다고 보고하였으며 Spadaro³²⁾는 골성장을 유발시킬수 있는 전류의 범위는 5 내지 20 microampere라고 하였다. 또한 Cochran, Gillolly, 그리고 Zengo³³⁻³⁵⁾ 등은 치아에 가해지는 기계적 응력의 효과와 그 결과로 발생된 치조골의 생물학적 전기적 전위차에 대해 보고하였으며, 치아 이동시 치조골에서 발생하는 전기적 전위차를 측정하는 방법을 보고하였다.

파괴된 치주조직을 치료하는 방법중 골조직 회복이 가장 중요한 문제이며 연령의 증가로 인한 골소공증의 예방 및 치료분야의 연구에서도 조골기전의 규명이 아직 미해결인 상태로 남아 있다. 의학 분야에서 세포생물학의 발전은 조골과정을 연구하는 데 있어서 연구 방법론을 발전시키고 정확한 기전들을 규명하는데 많은 기여를 하여왔다. 치의학 분야 특히 치주과학 영역에서도 이러한 노력들이 진행되어 있는데 인간의 배양 치은섬유아세포와 치주인대세포의 생화학적 성상을 비교 검토한 연구³⁶⁾와 토끼의 치주인대세포가 in vitro 상에서 석회화물질을 형성한다는 보고도 있었다³⁷⁾. 또한, Melcher 등³⁸⁻³⁹⁾은 치근막 인대세포를 골기질 상 및 상아질 기질상에 배양하면 신생골양조직이 형성된다고 보고하고 있다.

최근에 들어와 여러 학자들이 배양한 골수 세포가 연골이나 골형성 세포로 분화하여 태생기의 골형성을 야기 한다는 사실을 밝혀내었다.⁴⁰⁾ 이러한 골수유래 전구세포를 Mesenchymal stem cell이라 하였고 이 세포는 배양조건의 변화에 의해 발현되는 세포표현형에 차이가 있어 수종의 간엽 표현형을 갖고 있다고 보고하였다. 그리고 이런 Mesenchymal stem cell은 다양한 조직으로 분화가 가능하다고 발표하였다⁴¹⁻⁴²⁾.

또한 치조골로부터 배양한 세포에 He-Ne Laser를 조사하여 석회화를 촉진시키는 연구를 시도하여 Laser조사횟수가 많아질수록 세포증가가 빨라졌으며 Alkaline phosphatase activity의 활성이 증진되고 석회화물질형성이 촉진됨을 발견하였다⁴³⁾. Bellows⁴⁴⁻⁴⁵⁾는 백서의 두개 관으로부터 골세포를 배양하여 Glucocorticoids의 투여가 골세포의 석회화결정형성에 중요한 역할을 한다고 보고하기도 하여 석회물질 결정에 여러 요인이 작용함을 제시하였다.

최근의 연구동향을 보면 in vitro 상에서 배양세포의 배양조건에 따라 표현형에 차이가 있고 또 이들 배양세포를 이용한 조직재생방법을 모색하는 추세로 세포생물학의 임상화가 추진되고 있는 실정이다⁴⁶⁻⁴⁷⁾.

치의학 분야에서도 세포생물학의 발전은 연구방법론과 정확한 기전들을 규명하는데 많은 기여를 하여왔다. 인간의 배양 치은섬유아세포와 치주인대세포의 생화학적 성상을 비교검토한 in vitro 연구에 의하면 치주인대세포가 높은 Alkaline Phosphatase activity를 나타내었고^{48, 36)}, 토끼의 치주인대세포가 in vitro 상에서 Alizarin red에 농염되는 석회화물질을 형성하는 것으로 보고 하고 있다³⁷⁾. 또한, Melcher 등³⁸⁻³⁹⁾은 치근막인대세포를 골기질 상 및 상아질 기질상에 배양하면 신생골양조직이 형성된다고 보고하였다.

이러한 최근의 연구에 의하여 일부 학자들은 치주인대세포를 골원성섬유아세포 또는 osteoblastic fibroblast라고 부르기도 한다⁵⁰⁻⁵¹⁾.

Skeletal mass의 유지를 위해 필수불가결한 기계적 에너지 대신 전기적 에너지를 이용할 수 있다는 가능성이 제시되었다 하겠다. McElhaney 등⁵¹⁾은 정전기장을 이용하여 폐용성 다공증을 개선시키는데 성공하였으며, Martin 등⁵²⁾도 이런 정전기장이 매우 효과적으로 사용될수 있다는 것을 증명하였다.

최근에 들어와 여러 학자들이 배양한 골수

세포가 연골이나 골형성 세포로 분화하여 태생기의 골형성을 한다는 사실을 밝혀내었다^{40, 53-56)} 이러한 골수 유래 전구세포를 Mesenchymal stem cell이라 하였고 이 세포가 수종의 간엽 표현형을 갖고 있다고 보고하였다. 그리고 이들 Mesenchymal stem cell은 골조직, 골수, 진피, 지방조직, 근육, 결합조직, 인대, 건, 연골등으로 다양하게 분화가능하다고 발표하였다⁵⁷⁾. 이러한 결과는 배양조건변화가 발현되는 세포 표현형에 차이를 야기한다는 일부학자들^{41, 58)}의 보고와 일치한다.

국내에서는 아직 세포배양술의 기술축적이 이루어지지 않아 치의학 영역에 많은 연구가 부족한 실정이다. 최근들어 생명공학분야와 생물학, 농업등에서 신제품 개발에 세포배양법을 이용해 좋은 결과를 보고하고 있다. 치의학 영역에서는 세포생물학을 기초로 단위세포 배양을 통해 세포의 형태를 관찰하고 치근에 치모세포가 부착하는 양상을 관찰하거나 각종 호르몬이 세포에 작용하는 영양을 관찰하는 연구들을 부분적으로 진행하고 있다⁵⁹⁻⁶²⁾.

본 실험은 저주파의 전기적 자극이 상실된 치주조직의 재생에 어떠한 영향을 끼치는 지를 알아보고자 시행하였다. 연구 결과 In vivo에서 골형성을 촉진한다고 알려진 저주파 자극(10uA에서 30 Hz)의 영향이 in vitro에서의 골세포 기능에 미치는 효과를 살펴보았다. 세포의 정상적인 증식에 가장 적합한 세포 밀도인 5×10^4 cells/cm²에서 12시간의 저주파 자극을 가한 후 60시간동안 배양한 두개관 세포를 실험에 사용하였다. 저주파 자극은 두개관 세포의 증식과 단백질 합성능을 저하시켰고 alkaline phosphatase 활성도는 유의적으로 증가시켰다.

한편 골 성장에는 수많은 요인들이 복잡하게 상호작용하고 있기 때문에 골형성기전의 많은 부분을 아직도 밝히지 못하고 있다. 치주조직은 4가지 세포로 구성되어 있고 이 중

치조골은 타부위와 마찬가지로 재생에 어려움이 많다.

Alkaline Phosphatase는 골화과정을 나타낼 수 있는 표식자로 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화 부위에서 국소적으로 인산 이온의 농도를 증가시키는 효소로서 calcium phosphate를 세포 기질에 침착시킴으로서 석회화를 유도하는 기능을 갖는다. 또한 단백질을 인단백질로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가짐으로서 인단백질이 석회화의 핵으로서의 역할을 한다고 하였다.

따라서 본 효소의 증가를 통해 전기자극 자체가 배양두개관 골세포의 석회화 과정에 촉매제로서 역할을 하는 것이 확인되었으며 향후 대상세포의 종류와 자극되는 전기의 크기와 시간에 따른 연구가 진행되어야 한다고 생각한다.

V. 요약

치주질환으로 인해 파괴된 치주조직을 치료하기 위해 지금까지 여러 가지 임상적인 술식을 사용하고 있다. 또한 인체의 생물학인기전을 활용하여 치주조직의 재생을 더욱 증진시킬 수 있는 치료법을 개발하기 위해 많은 실험적 접근들을 현재 진행하고 있다. 치근면의 물리적 성질을 변화시켜므로 치주조직 세포의 부착을 증진시켜주는 기계적, 화학적 치료법과 골이식술, 조직유도재생술을 임상에서 사용해 왔으며, 각종의 성장인자와 같이 치주조직 재생을 증진시키는 물질을 연구하기 위한 실험들이 진행되고 있다.

골형성시 관여하는 세포의 활동을 직접 조절하거나 세포의 미세환경을 간접적으로 변화시킴으로 환경이 골목할 만한 영향을 받는 점에 착안하여 전기적 자극을 외부에서 가할 때 발생하는 영향을 규명하고자 이 연구를 실시하였다.

본 실험은 저주파의 전기적 자극이 상실된

치주조직의 재생에 어떠한 영향을 끼치는 지를 알아보려고 시행하였다. 연구 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

저주파 자극(10uA에서 30 Hz)은 두 개관 세포의 증식과 단백질 합성능을 저하시키고 alkaline phosphatase 활성도는 유의성 있게 증가시켰다.

본 연구결과 미세전류가 골조직 재생에 긍정적인 영향을 미친다는 사실이 확인되어 향후 전기자극기의 소형화와 생체실험을 통하여 임상에 응용할 수 있는 전기적 자극기 개발에 기초자료가 될 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Terranova, V.P. and Wikesjo, U.M.E. : Extracellular materices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. J Periodontol. 58: 371-374, 1987
2. Caffesse, R.G, Kerry, G.J., Chaves, E.S. et al : Clinical evaluation of the use of citric acid and autologous fibronectin in periodontal surgery. J.Periodontol 59: 494-499, 1988
3. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J. Clin Periodontol. 11: 494-498, 1984
4. Blumenthal, N.M. : The use of collagen membranes to guide regeneration of new
5. Magnusson,I., Batich, C. and Collins, B.R. : New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. J Periodontol 59: 1-4, 1988
6. 박 준봉, 이만섭 : Bioceramic 제제의 성

- 견 치조골결손부 재생에 관한 실험적 연구. 경희치대논문집. 7: 159-174, 1985
7. Froum, S. and Stahl, S.S. : Human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. *J Periodontol* 58: 103-106, 1987
 8. Gantes, B., Martin, M., Garret, S. and Egelberg, J. : Treatment of periodontal furcation defects. *J Clin Periodontol* 15: 232-236, 1988
 9. Garrets, S., Loos, B., Chamberlin, D. and Egelberg, J. : Treatment of intraosseous periodontal defects with a combined adjunctive therapy of citric conditioning, bone grafting, and placement of collagenous membranes. *J. Clin. Periodontol.* 15: 383-387, 1988
 10. Lynch, S.E., Williams, R.C., Polson, A.M. et al : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* 16: 545-548, 1989
 11. 조무현, 박광범, 박준봉 : 혈소판유래 성장인자-BB 가 성견 치근이개부병변의 조직재생에 미치는 효과. 대한치주과학회지 23(3) : 535-563, 1993
 12. Kenneth J.M., Henry J.D., Paul E.L. and Marie-Anne F. : Electric fields modulate bone cell function in a density-dependent manner. *J. Bone Miner Res* 8: 977-984, 1993
 13. Gray T. K., Flynn T.C., Gray K.M. and Nabell L.M. : 17- β -Estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR106. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6267-6271, 1987
 14. Grigoriadia A.E., Petkovich P.M., Rosenthal E.E. and Heersche J.N.M. : Modulation of retinoic acid of 1,25-dihydroxyvitamin D effects on alkaline phosphatase activity and parathyroid hormone responsiveness in an osteoblast-like osteosarcoma cell line. *Endocrinology* 119(2): 932-939, 1986
 15. Sato K., Han D. C., Fuji Y., Tsushima T. and Shizume K. : Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells(ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology* 119(2): 932-939, 1987
 16. Mathews A.P.: Electric polarity in the hydroids. *Amer.physiol.*, 8: 294-299, 1903.
 17. Lund E.J.: Experimental control of organic polarity by the electrical current. I. Effects of the electric current on regenerating interrodlets of obelia commissuralis. *J.Exp. zool*, 34: 471-493, 1921.
 18. Yasuda I., Noguchi K., and Sata T.: Dynamic Callus and electrical callus. *J.Bone Joint Surg.*, 37A: 1292-1293, 1955.
 19. Bassett C.A.L.: Current concepts of bone formation. *J. Bonejoint surg*, 44A: 1217-44, 1962.
 20. Brighton C.T., Friedenberg Z.B., Zemsky L.M., and Pollis R.P.: Direct current stimulation of nonunion and congenital pseudoarthrosis. Exploration of the clinical application. *J. Bone Joint Surg.*, 57A: 368, 1975.
 21. Friedenberg Z.B., Andrews E.T., Smolenski B.I., Pearl B.W., and Brighton C.T.: Bone reaction to varying amounts of direct current. *Surg. Gyn.Obs.*, 131:

- 894, 1970.
22. Shamos M.H. and Lavine L.S.: Piezoelectricity as a functional property biological tissues. *Nature(Lond.)* 213: 267-269, 1967.
 23. Fukada E., and Yasuda I.: Piezoelectric effects in collagen. *Jap. J. Appl. Phys.*, 3: 117-121, 1964.
 24. Shima I., Yamauchi S., Matsumoto T., Kunishita M., and Shinoda K.: A new method for monitoring circulation of grafted bone by case of electrochemically generate hydrogen. *Clin. Orthop.*, 198: 244-249, 1985.
 25. McElhaney J.H.: Load and electric change relationships for cortical bone. *Craniofacial growth in man*, eds. Moyers R.E. and Krogram W.M., Publisher Pergamon press, 35-43, 1967.
 26. Bassett C.A.L. and Becker R.O. : Generation of electrical potentials by bone in response to mechanical stress. *Science* 137: 1063-1064, 1962.
 27. Jahn T.L.: A possible mechanism for the effect of electrical potentials on appetite formation in bone. *Clin. Orthop.*, 56: 261-273, 1968.
 28. Bassett C.A.L.: Biologic significance of piezoelectricity. *Calc. Tiss. Res.*: 00: 252 - 272, 1968
 29. Harrington D., and Becker R.O.: Electrical stimulation of RNA and protein synthesis in the frog erythrocyte. *Exp. Cell Res.*, 76: 95, 1973
 30. Norton L.A.: Implantation of bioelectric growth control in orthodontics and dentistry. *Angle Orthod.*, 45: 34-42, 1975
 31. Becker R.O., and Murray D.G.: A method for producing cellular differentiation by means of very small electric currents. *Ann NY Acad. Sci.*, 29: 606, 1967
 32. Spadaro J.A.: Electrically stimulated bone growth in animal and man: Review of literature. *Clin. Orthop.* 122: 325-332, 1977
 33. Cochran G.V., Pawluk R.J., and Bassett C.A.L.: Stress generated electric potentials in the mandible and teeth. *Arch Oral Biol.* 12: 917-920, 1967
 34. Gillolly C.J., Hosley R.T., Mathews J.R., and Jewett D.L.: Electrical potentials recorded from mandibular alveolar bone as a result of forces applied to the tooth. *Am. J. Ortho.*, 54: 649-654, 1968
 35. Zengo A.N., Pawluk R.J., and Bassett C.A.L.: Stress induced bioelectric potentials in the dentoalveolar complex. *Am. J. Orthod.*, 64: 17 -27, 1973
 36. Ohshima, M., Kuwata, F., Otsuka, K., Saito, R., Sato, K., Shioji, S. and Suzuki, K. : Alkaline phosphate activity of cultured human periodontal ligament cells. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 30: 208-217, 1988
 37. 原田秀一郎 : ウサギの歯根膜細胞の細胞特性 I. 石灰化物形成およびアルカフォスファターゼ活性, 1992.
 38. Melcher, A.H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E. and Shiga, E. : Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone: a light and electronmicroscopic study. *J. Periodont. Res.*, 21: 592-612, 1986
 39. Melcher, A.H., McCulloch, C.A.G., Cheong, T., Nemeth, E. and Shiga, E. : Cells from bone synthesize cementum-

- like and bone-like tissue in vitro. J. Periodont. Res. 22: 246-247, 1987
40. Bruder, S.P. and Caplan, A.I. : First bone formation and the dissection of an osteogenic lineage in the embryonic chick tibia is revealed by monoclonal antibodies against osteoblasts. Bone 10: 359-375, 1989
 41. Ohgushi, H., Goldberg, V.M. and Caplan, A.I. : Heterotopic osteogenesis in porousceramics induced by marrow cells. J. Orthop Res 7: 568-578, 1989
 42. Caplan, A.I. : Cell-mediated bone regeneration. cited in The Bone-biomaterial interface. University of Toronto Press, pp 199-205, 1991
 43. 氏家久 : He-Ne レーザ-照射がヒト齒槽骨由來細胞に及ぼす影響に関する研究 - とくに 細胞増殖, 活性および nodule形成について- 日齒周誌 35(1): 54-62, 1993
 44. Bellows, C.G., Aubin, J.E. and Heersche, J.N.M. : Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. Endocrin. 121(6): 1985-1992, 1985
 45. Bellows, 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
 46. 池田賀剛: 人工骨移植材のヒト骨芽細胞様細胞に対する親和性 -利殖材周囲の接着性蛋白質の 經時的變化- 日齒周誌 35(1): 84-94, 1993
 47. 松原茂 : 齒根膜細胞の分化調節に関する實驗的研究 -Transforming Growth Factor- β の影響について- 日齒周誌, 35(2) 333-346, 1993
 48. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치은섬유아세포와 치주인대세포의 세포 성장에 관한 비교. 대한구강생물학회지 15(1): 14-27, 1991
 49. Nojima, M., Kobayashi, M., Shinome, M., Takahashi, N., Suda, T. and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. J. Periodont. Res. 25: 179-185, 1990
 50. Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R. and Somerman, M.J. : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. J. Periodontol., 62: 499-503, 1991
 51. McElhaney J.H., Stanker R., and Bullard r. : Electric fields and bone loss of disuse. J. Biomech., 1: 47, 1968
 52. Martin, R.B., and Gutman w. : the effects of electric fields on osteoporosis of disuse. calcif. Tiss. Res., 25: 23, 1978.
 53. Haynesworth, S.E., Baber, M.A. and Caplan, A.I. : Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone 13:359-375, 1992
 54. Klinefelter, G.R. : A novel system for the co-culture of epididymal epithelial cells and sperm from adult rats. J. Tiss. Cult. Meth. 14: 195-200, 1992
 55. 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
 56. Williams, D.C., Boder, G.B., Toomy, R.E. et al : Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat

- bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 30: 233-246, 1980
57. Nakahara, H., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E., Holecek, J.J., Baber, M.A., Goldberg, V.M, and Caplan, A.I : Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11: 181-188, 1990
58. 박준봉, 서조영, 김해동 : Tricalcium phosphate가 치주인대세포의 성장에 미치는 영향.
59. 이종원, 김관식, 정동균 : 백서태두개관 배양시 Prostaglandin E₂가 용해소체효소 유리에 미치는 영향. *대한구강생물학회*. 7:25-31, 1983
60. 김용진, 정동균 : 골조직 배양에 있어서 골 흡수에 미치는 Bovine Serum Albumin의 영향에 관한 연구. *대한구강생물학회*. 9: 41-45, 1985
61. 이진미, 서조영, 박준봉 : 치주인대세포의 부착과 전개에 관한 형태학적 관찰. *대한치주과학회지* 23(1): 97-108, 1993
62. 조혜연, 강선주, 고재승, 황성명 : Tumor Necrosis Factor- α 에 의하여 저칼슘식이 생쥐 골수세포에서 분화된 파골세포양세포의 상아질 흡수. *대한구강해부학회지* 17(1): 99-112, 1993

A study of the effects of electric current on the mineralization of the cultured calvaria bone cells

Joon-Bong Park¹, In-Sik Hur¹, Hye-Ja Lee¹, Young-Chul Choi²

Department of Periodontics¹ and Pedodontics², Dental College, Kyunghee University

To date, various clinical procedures have been used to restore periodontal apparatus destroyed by periodontal disease. And then, many experimental approaches have been proceeded to develop treatment methods to promote periodontal regeneration. Mechanical, chemical treatments to enhance the attachment of periodontal tissue cells as changing the physical properties of root surfaces, bone graft procedure, and treatments for guided tissue regeneration have been used for periodontal regeneration. However, recent studies have revealed that biologic factors such as growth factors promote biologic mechanism associated with periodontal regeneration.

This study was done to enucleate how ELF stimulus affect the periodontal regeneration. We can have following conclusions from this experimental results.

The influence of low frequency(ELF) electric stimulus (30Hz at 10 μ A) known to promote bone formation in vivo, was evaluated for its ability to affect bone cell function in vitro.

After 12 hour exposure of ELF stimulus at most appropriate densities (5 \times 10⁴ cells/cm²) to increase osteoblastic cells normally, rat calvarial cells were incubated for 60 hours were used in this study.

We have found ELF stimulus suppress calvarial cell proliferation and the ability of protein synthesis, enhance the alkaline phosphatase activity significantly.