대치교정지 1998, 28(1) : 143-153

PDGF와 LPS가 치주 인대 세포의 활성에 미치는 영향에 관한 연구

허 정[1] · 임 정 현[2] · 김 상 철[3]

PDGF와 LPS는 골 대사에 중요한 조절요소이다. 외인성 PDGF는 골 흡수를 자극하기도 하고, 또 새로운 골 형성을 자극하기도 한다. LPS는 골파괴 활성의 자극 요인으로 알려져 있다.

본 연구의 목적은 골개조에 중요한 역할을 하는 치주 인대에 PDGF와 LPS의 상호 작용을 평가하기 위해서 시행되었다.

배양된 사람의 치주 인대 세포에 PDGF와 LPS를 첨가 배양하여 각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포 활성의 평균과 표준 편차를 구하고 ANOVA를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PDGF를 단독으로 가한 경우 0.1ng/ml에서는 세포 활성이 대조군과 차이가 없었으나 1ng/ml에서는 배양 2일째에, 10ng/ml에서는 배양 2,3일째에 유의한 세포 활성 증가를 보였다.
2. LPS단독처리시 0.5μg/ml 및 5μg/ml농도에서 배양 1일째,2일째에는 대조군과 차이가 없었으나 배양 3일째에 유의한 활성 감소가 없었다.
3. 0.5μg/ml 및 5μg/ml농도의 LPS에 1ng/ml 및 10ng/ml농도의 PDGF 첨가시, 배양 3일째에 LPS단독 투여시보다 유의한 세포 활성 증가가 있었으며 특히 10ng/ml PDGF 첨가시에는 대조군보다 활성이 컸다.

이상의 연구결과로 골개조 과정에 관여하는 것으로 여겨지는 치주 인대세포에 대한 적절한 농도의 PDGF와 LPS의 복합 투여는 PDGF 단독 투여 못지 않게 치주 인대세포의 활성을 증가시키는 것으로 사료된다.

(주요단어 : PDGF, LPS, 골 개조)

Ⅰ. 서 론

골조직은 세포외기질과 여러 종류의 세포들을 포함하고 있는 복잡한 조직으로서 일생동안 골개조가 반복되는 동적인 조직이며[1], 교정치료시 치아이동은 치주인대세포를 매개로 골조직 개조의 결과로 여겨지며 이때 관여하는 세포들의 활성이 치아이동의 정도에 영향을 끼치는 것으로 생각되고 있다[2].

골조직의 성장과 개조에 관여하는 조골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성은 여러가지 호르몬 등의 전신적 인자와 cytokine과 같은 국소적 인자에 의하여 조절되고 있다[3,4]. 국소적 조절물질은 주로 골세포에 의하여 생성되어 골기질에서 발견되고 있다[5]. Terranova와 Wikesjö[6]는 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외 기질의 특이한 상호작용과 polypeptide growth factor(PGF)에 의해 조절되며 치주조직 재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라고 시사하였다.

[1] 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 대학원생
[2] 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 대학원생
[3] 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 교수

많은 종류의 PGF 중 창상치유에 관여하는 성장인자로써 platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor, transforming growth factor, insulin-like growth factor(IGF), interleukin-1 등이 있으며[7], 이중 PDGF는 중배엽의 세포 즉 섬유모세포, 신경세포, 평활근세포, 골세포의 작용을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[8,9].

PDGF는 9.8의 isoelectric point와 30kDa의 분자량을 가지고 있는 조절성 단백질로서 단종이량체(PDGF-AA, BB)와 이종이량체(PDGF-AB)로 존재함이 발견되었고[10,11], 주로 혈소판의 α-granule로부터 유리되는 것으로 알려져 있으며[12], 단핵세포 및 대식세포[13], 섬유모세포[14], 내피세포[15], 골기질[16] 등에서도 분리된다고 밝혀졌다.

PDGF에 관한 시험관 연구에서 Piche와 Graves[17]는 골 유래세포 배양시 PDGF를 첨가한 경우 세포의 증식율이 촉진되었다고 하였고, Rutherford등[18]도 PDGF가 섬유모세포를 증식시킨다고 보고하였다.

생체에서의 PDGF 효과로서, Lynch등[19,20]은 돼지의 피부창상부위에 PDGF적용시 적용농도에 따라 신생 결체조직과 내피층의 두께가 증가됨을 관찰할 수 있었고, IGF와 함께 투여시 PDGF단독 투여보다 더 많은 양의 신생결체조직이 형성됨을 보고하였으며[21], Pierre등[22]은 PDGF 단독투여시 창상치유에 효과적이었다고 보고하였다. 또한 Lynch등[23]은 PDGF나 IGF-1를 단독으로 치주결손부에 적용하였을때 신생 치조골과 신생 백악질의 형성을 자극한다고 하였으며 PDGF와 IGF-1을 혼용하였을 때 상승 효과가 있다고 보고하였고, 또 다른 연구[24]에서 PDGF를 치아 매식에 응용해 주입해 본 결과 매식체주위로 치조골이 형성됨을 보고 하였다.

치조골의 파괴에 관해서는 prostaglandin E_2 등 파골세포 활성인자를 비롯하여 lipopolysaccharide(LPS)에 대하여 많은 연구들이 진행되어 왔는데[25,26,27], LPS는 그람 음성세균의 세포막을 이루고 있는 구성성분으로 polysaccharide, phospholipid 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며[28], 세균의 급속한 성장시기나 세균의 외막이 손상된 경우에 유리된다[29,30].

LPS가 배양 골조직에 가해질 경우 Ca유리를 촉진시키며[31], 용해소체효소 유리에도 영향을 미친다는 연구가 있다[32,33]. 또한 LPS는 교원분해효소의 작용을 증가시키며, 부갑상선호르몬, prostaglandin E_2 및 파골세포 활성화 인자 등 다른 골조직 흡수 촉진 유도물질의 작용을 상승키는 효과를 가지고 있다고 보고된 바 있다[34].

Reitan[2]과 Raisz[35]는 교정력에 의한 치아이동시 치조골의 변화에 대한 조직학적 고찰을 통하여, 교정력이 치주인대를 통하여 전달됨으로 치주인대 및 그 곳에 존재하는 세포들을 잘 관찰하는 것이 치아의 이동기전에 관한 의문을 해결할 수 있으며, 교정력에 의한 골 개조에서 치주인대세포의 중심적 역할을 강조한 바 있으나 골흡수물질로 알려진 LPS와 성장촉진인자인 PDGF의 치주인대세포에 대한 직접적인 영향에 관한 연구는 미약한 실정이다.

골흡수 물질로 알려진 LPS와 성장촉진인자인 PDGF가 골개조에서 중심적 역할을 하는 치주인대세포에 대해 미치는 생물학적 영향을 알아보고자 배양된 사람 치주인대세포에 LPS와 PDGF를 첨가 배양하여 세포활성도의 변화를 평가한 결과 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

1) 연구재료

시험에 사용한 PDGF(Sigma Co., USA)는 1, 5, 20, 50 ng/ml의 농도로 사용하였으며, 세균의 내독소는 Fusobacterium nucleatum 10953에서 분리한 lipopolysaccarides를 사용하였다. 세균의 배양은 Schadeler 배지를 이용하여 냉동보관중인 균주를 혐기성 배양기(80% N_2, 10% H_2, 10% CO_2: Coy lab products, USA)를 이용하여 37℃에서 통상적으로 36시간 배양하였다. 배양된 세균은 원침(10,000×g, 20min, 4℃)하여 멸균된 생리 식염수로 3회 세척한 후 증류수로 1회 세척하여 동결건조하였다. 건조시킨 균체를 200 mg이 되도록 하여 분산 시킨 후 동일한 양의 90% 68℃의 phenol(Merck Co., USA)과 혼합하여 15분간 교반하여 반응시켰다. 그 후 얼음물에 10℃까지 식힌 후 10,000×g로 30분간 원침시킨 후 상층 수용액부분을 채취하고 동일량의 증류수를 가하면서 2회 반복하여 수집된 수용액을 72시간 동안 투석시킨 후 냉동건조하여 LPS를 분리하였다.

2) 연구방법

1. 치주인대세포의 배양

본 연구에서 치주인대세포는 교정 목적으로 발거한 소구치나 제3대구치의 건강한 치주인대를 절제하여

얻었다. 발치한 치아로 부터 채취한 치주인대 조직을 40% 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, Gibco Co., USA)를 가한 α-Minimal Essential Medium(MEM, Gibco Co., USA)로 3회 세척하였다. 치은 및 치주인대 조직을 세척한 후 60mm 세포배양용 배양접시(Nunc Co., USA)로 옮겨 약 $1mm^3$로 세절하였다. 세절한 조직은 20분간 37℃ 5% CO_2, 습도 100% 배양기(Bantex 1820IR, Shel-lab, USA)에서 배양접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 2ml 의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 첨가한 MEM을 가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다.

단일세포층이 형성된 배양접시 내의 배양액을 제거하고 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco Co., USA)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한 후 0.25% trypsin/EDTA (Gibco Co., USA)를 배양접시 당 2ml씩 넣고, 3분간 bench상에 방치한 후 피펫을 이용하여 배양접시에 부착된 부착세포를 분리시키고 5ml 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1200 rpm으로 10분간 원침하였다. 원침 후 상청액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한 후 Vortex mixer로 혼합하고 세포부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2일 혹은 3일 간격으로 교환하였으며 본 실험에서는 5회 내지 8회 계대배양한 치주인대세포를 이용하였다.

2. PDGF와 LPS에 의한 치주인대세포의 형태 변화 관찰

5회 계대 배양된 치주인대세포를 24-well plate에 분주하기 전 trypan-blue로 염색한후 hemocytometer에 옮겨 도립 현미경 상에서 세포수를 세어서 well당 10,000개의 세포를 분주하고 1일간 배양을 실시하였다.

1일간 배양 후 LPS(0.5μg/ml, 5.0μg/ml) 혹은 PDGF(0.1, 1.0, 10.0ng/ml)를, 혹은 혼합하여 well당 1ml 씩 가한후 3일간 배양하여 이를 농도와 기간별로 분류한 다음 도립현미경(IMT2-21, Olympus, Japan)을 이용하여 세포의 형태를 관찰하였다.

3. PDGF와 LPS에 의한 치주인대세포의 활성 변화 관찰

PDGF 혹은 LPS를 가한 후 1, 2, 3일간 배양하여 세포활성을 측정하였다. 세포활성을 측정하기 위해 생리식염수에 용해한 MTT 용액(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide: Sigma Co., USA)을 50μg/ml의 농도로 200μl를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양 후 MTT용액을 버리고, dimethyl sulfoxide(DMSO)를 200μl를 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 세포활성도의 측정을 위해 96-well plate 상으로 옮겼다. plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(model ETY-96, Toyo Instruments Inc., Japan)에 plate를 넣고 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 비처리세포군으로 하였으며 세포활성도는 대조군에 대한 실험군의 백분율로 산출하였다.

4. 통계 분석

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포활성의 평균과 표준편차를 구하고 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 통계적 차이를 평가하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. PDGF와 LPS가 치주인대세포의 형태에 미치는 영향

도립현미경으로 관찰한 치주인대세포의 형태는 배양액을 가한 대조군(Fig.1)과 LPS 및 PDGF를 가한 1일군에서는 세포 형태의 뚜렷한 차이를 보이지 않는 정상적인 세포돌기를 보였고(Fig. 2, 3, 4), 2, 3일군에서도 LPS의 존재와 PDGF 투여 농도에 관계없이 군간의 차이가 없었다(Fig. 5, 6).

2. PDGF와 LPS가 치주인대세포의 활성에 미치는 영향

1) PDGF를 단독으로 가한 군 (Table 1)

PDGF 단독처리시 0.1ng/ml에서 배양 1일째에 세포활성이 101.89± 3.36, 2일째에는 99.59 ± 2.88, 3일째에는 97.86 ± 3.82로 모두 대조군과 차이가 없었고 1ng/ml 농도 투여시에도 배양 1일째에는 102.89± 1.04로 차이가 없었으나 배양 2일째에 127.43 ± 2.10로 유의한 활성 증가를 보였다($p<0.05$). 10ng/ml에서 배양 1일째에는 106.12 ± 6.10, 2일째에는 115.45 ± 6.22, 3일째에는 119.42 ± 7.15로 배양 2, 3일째에 유

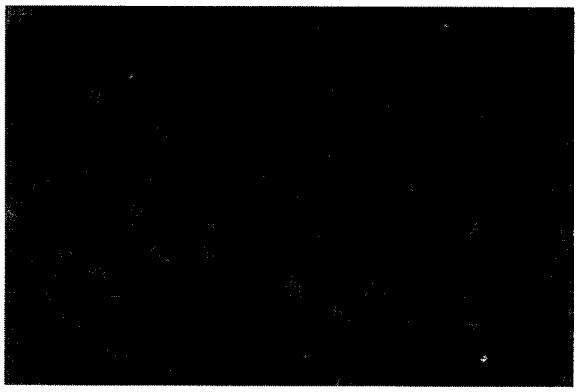

Fig. 1. Control group at 1 day after cultivatuion. The periodontal cells had their normal stretched cytoplasmic processes. (X100)

Fig. 2. LPS(5.0㎍/ml) group at 1 day after cultivation. (X100)

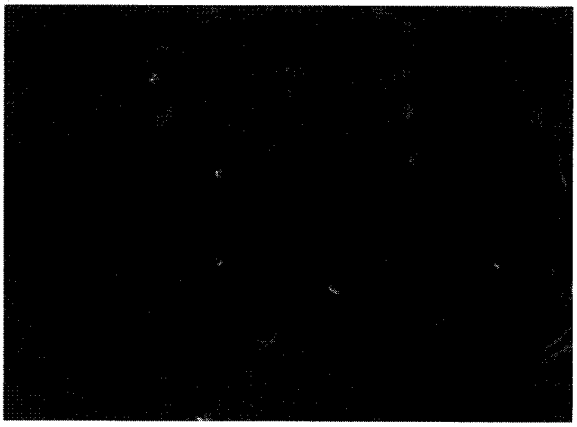

Fig. 3. PDGF(10.0ng/ml) group at 1 day after cultivation. (X100)

Fig. 4. LPS(5.0㎍/ml) and PDGF(1.0ng/ml) group at 1 day after cultivation. (X100)

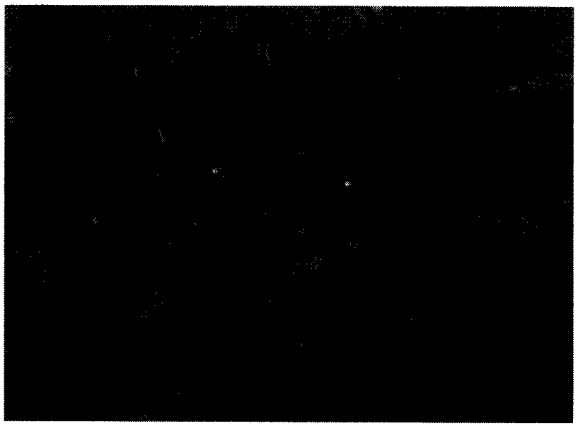

Fig. 5. LPS(0.5㎍/ml) and PDGF(10.0ng/ml) group at 2 days after cultivation. (X100)

Fig. 6. LPS(0.5㎍/ml) and PDGF(10.0ng/ml) group at 3 days after cultivation. (X100)

Table 1. The Effect of PDGF on the Viability of Human Periodontal Ligament Cells. (mean ± S.D.)

	1 day	2 days	3 days
control	100.00 ± 4.62	100.00 ± 5.57	100.00 ± 7.35
0.1ng/ml	101.89 ± 3.36	99.59 ± 2.88	97.86 ± 3.82
1.0ng/ml	102.89 ± 1.04	127.43 ± 2.10*	106.60 ± 6.03
10.0ng/ml	106.12 ± 6.10	115.45 ± 6.22*	119.42 ± 7.15*

* ; significantly different from control group ($p<0.05$)

Table 2. The Effect of LPS on the Viability of Human Periodontal Ligament Cells (mean ± S.D.)

	1 day	2 days	3 days
control	100.00 ± 2.61	100.00 ± 5.32	100.00 ± 3.02
0.5μg/ml	97.20 ± 2.00	96.46 ± 2.64	80.33 ± 6.41*
5.0μg/ml	97.52 ± 3.62	100.07 ± 8.84	80.29 ± 6.41*

* ; significantly different from control group ($p<0.05$)

Table 3. The Effect of LPS and PDGF on the Viability of Human Periodontal Ligament Cells (mean ± S.D.)

	1 day	2 days	3 days
control	100.00 ± 2.61	100.00 ± 5.32	100.00 ± 3.02
LPS(0.5μg/ml)			
+PDGF 0.1ng/ml	103.60 ± 4.20	95.17 ± 4.48	103.84 ± 6.91
1.0ng/ml	99.80 ± 7.15	99.42 ± 5.29	112.00 ±10.73†
10.0ng/ml	102.46 ± 7.03	99.49 ± 8.39	126.62 ± 8.28*†
LPS(5.0μg/ml)			
+PDGF 0.1ng/ml	101.77 ± 6.97	99.49 ± 5.29	106.79 ±15.86
1.0ng/ml	100.58 ±12.09	105.02 ±13.86	110.77 ± 8.88†
10.0ng/ml	93.25 ± 4.06	119.68 ± 6.01*†	127.66 ±14.53*†

* ; significantly different from control group($p<0.05$)
†; significantly different from LPS group($p<0.05$)

의한 세포 활성 증가를 보였다($p<0.05$).

2) LPS를 단독으로 가한 군 (Table 2)

LPS 단독처리시 0.5μg/ml 농도에서는 배양 1일째에 97.20 ± 2.00, 2일째에는 96.46 ± 2.64로 대조군과 차이가 없었으나 배양 3일째에 80.33 ± 6.41로 유의한 활성 감소가 있었다($p<0.05$).

5μg/ml 농도의 LPS를 투여한 배양 1일째에 97.52 ± 3.62, 2일째에 100.07 ± 8.84로 큰 차이가 없었으나, 3일째에 80.29 ± 6.41 로 유의한 활성 감소가 있었다($p<0.05$).

3) PDGF와 LPS(0.5μg/ml)를 동시에 투여한 군 (Table 3)

0.5μg/ml 농도의 LPS에 PDGF를 동시에 투여하여 배양한 후 1일째에, 0.1ng/ml 농도의 PDGF에서는

103.60 ± 4.20, 1ng/ml의 PDGF에서는 99.80 ± 7.15, 10ng/ml의 PDGF에서는 102.46 ± 7.03으로 대조군에 비해 큰 차이가 없었고 LPS 단독 처리군에 비해서도 차이가 없었다. 배양 2일째에도 0.1ng/ml 농도에서 95.17 ± 4.48, 1ng/ml에서 99.42 ± 5.29, 10ng/ml에서 99.49 ± 8.39로 전반적으로 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. 동시투여 3일째에는, PDGF 0.1ng/ml 농도에서는 103.84 ± 6.91으로 대조군과 차이가 없었으나, 1ng/ml의 PDGF에서는 112.00 ± 10.73으로 LPS 단독 투여시보다 높은 활성을 보였으며, 10ng/ml의 PDGF에서는 126.62 ± 8.28으로 대조군 및 LPS 0.5μg/ml 단독 투여시보다 세포활성이 유의하게 높았다($p<0.05$).

4) PDGF와 LPS(5μg/ml)를 동시에 투여한 군 (Table 3)

5μg/㎖ 농도의 LPS와 PDGF를 동시에 가하여 배양한 1일째에는, 0.1ng/ml 농도의 PDGF의 경우 101.77 ±6.97, 1ng/ml에서는 100.58 ± 12.09, 10ng/ml 농도에서는 93.25 ± 4.06으로 대조군에 비해 유의한 수준의 세포활성 변화를 보이지 않았다. 배양 2일째에, 0.1ng/ml 농도의 PDGF에서는 99.49 ± 5.29, 1ng/ml에서는 105.02 ± 13.86으로 대조군과 큰 차이가 없었으나, 10ng/ml에서는 119.68 ± 6.01으로 활성 증가를 보여 대조군 및 LPS 단독 투여시에 비해 유의한 차이가 있었다($p<0.05$). 배양 3일째에 0.1ng/ml 농도의 PDGF에서는 106.79 ± 15.86으로 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나 1ng/ml에서는 110.77 ± 8.88으로 LPS 단독 투여군에 비해 유의한 활성 증가를 보였고, 10ng/ml에서는 127.66 ± 14.53으로 대조군및 5μg/ml 농도의 LPS 단독 투여시보다 유의한 증가가 있었다 ($p<0.05$).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

교정력에 의한 치아이동은 치주인대를 매개로 골형성과 골흡수 과정을 통한 골개조(remodeling)에 의해 이루어지는데[35], 치아에 교정력을 가하면 치근막은 압축되거나 견인력을 받게 되어, 압박측에서는 파골세포가 나타나서 치조골을 흡수시키고 견인측에서는 조골세포가 나타나서 신생골을 첨가시키면서 치아가 이동하게 된다. 이와 같이 치주인대에서는 치은결체조직에서와 달리 골형성 능력이 있는 세포들이 분화되는 것으로 알려져 있다. Gould등[37], McCulloch등[38] 및 Davidson과 McCulloch[39]는 치주인대 조직내의 혈관 주변에 미분화된 전구세포를 관찰할 수 있다고 하였고, Aukhil등[40]은 치주인대내에 있는 전구세포는 치아의 상아질과 접촉시 백악아세포와 같은 재생 능력이 있는 세포로 분화한다고 하였다. McCulloch등[38]은 [^{3}H]-thymidine을 이용한 자가방사법으로 치주인대내에 존재하는 조골세포와 백악아세포의 전구세포 중 적어도 일부는 골수강에서 유래하여 치주인대내로 이주해 간다고 보고하였다.

치주인대세포는 조골세포의 기능을 나타내는 지표인 alkaline phosphatase 활성도가 높으며 제1, 3, 5형의 교원질을 합성하고 osteonectin, bone proteoglycan I, bone sialoprotein I 등을 생성함으로써 치주인대세포는 다른 결체조직에 존재하는 세포와 달리 경조직을 형성하는 세포의 특성과 유사하다는 연구가 계속 보고되고 있다[41,42].

1974년 Ross등[43,44]과 Kohler와 Lipton[45]은 각각 혈소판으로 부터 동맥의 평활근 세포의 증식을 자극하는 PDGF를 발견하였고, 그후 Antoniades등[46]과 Raines와 Ross[47], Heldin등[48]에 의해 PDGF 분리법이 개발 명명되었고, PDGF의 고유 성격도 차츰 밝혀지게 되었다. PDGF를 유리하는 세포는 혈소판 이외에 단핵 세포 및 대식 세포, megakaryocyte, 내피 세포 외에도 다수의 세포[43,49]가 있는 것으로 밝혀졌다. 그러므로 이 PDGF라는 용어는 PDGF가 혈소판 뿐 아니라 다양한 세포에 의해 합성되기 때문에 잘못된 용어라 주장하는 학자도 있다[50]. PDGF에 대한 시험관적 연구[17,18]는 물론 조직치유에 미치는 영향[51-55]과 경조직형성에 미치는 영향[21,23,24] 등이 활발하게 진행되었다.

Canalis[56]는 시험관 연구에서 배양된 쥐의 두개관 세포에 PDGF 적용시 DNA 합성을 증가시키고 단백질 합성에는 비특이성 자극효과가 있다고 보고하였으며 Rutherford등[18]은 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유모세포를 대상으로 PDGF의 효과를 규명한 실험에서 각 세포의 증식에 유효하다고 보고하였으며, Matsuda등[57]은 배양된 쥐의 치주인대세포에 PDGF 적용시 세포의 증식, 화학주성, 교원질 합성을 증가시킨다고 보고하였고 Oates등[58]은 PDGF가사람의 치주인대세포에 주입되었을 때 치주인대세포의 증식을 조절하는 역할을 한다고 주장하였다.

Nister등[59]과 Kazlauskas등[60]은 PDGF-BB와 AB가 사람의 섬유모세포에서 DNA 합성을 자극하는 동일한 강도를 가지고 있으나 PDGF-AA는 세포 유사분열에 대한 활성도가 약하게 나타난다고 보고하였

다. Ramakrishnan과 Cho[61]는 쥐의 치주인대세포에는 세포의 주화성과 증식에 중요한 역할을 하는 β형태의 PDGF 수용기가 존재함을 보고하였고, Oates등[58]은 사람의 치주인대세포에 PDGF-AA, BB를 투여한 결과 PDGF-AA, BB 모두 DNA합성을 증가시켜 사람의 치주인대세포에는 α와 β수용기가 존재할 것이라고 시사하였다.

본 연구에서는 섬유모세포및 골세포에 강한 화학주성 및 증식효과가 있다고 알려진 PDGF-BB를 재료로 사용하여 PDGF-BB가 치주인대세포증식에 미치는 영향을 알아 본 결과 PDGF 단독처리시 0.1ng/ml에서는 세포활성이 배양 1일, 2일, 3일에 모두 대조군과 차이가 없었으나 1ng/ml 농도투여시 배양 2일째에 127.43 ± 2.10로 유의한 활성증가를 보였고 통계학적 유의성이 있었으며($p<0.05$), 10ng/ml에서 배양 2, 3일째에 유의한 세포활성 증가를 보여 ($p<0.05$), PDGF를 투여한 군에서는 농도가 증가함에 따라 세포활성이 증가하는 경향을 나타냈다. 이는 Canalis[18], Canalis등[62], Matsuda등[57],Oates등[63]의 연구결과와 유사하였다. 그러나 세포활성 정도는 Matsuda등[57]과 Oates등[58]가 보고한 양보다 본 실험에서는 낮게 나타났는데 이는 실험방법의 차이, 각 well 당 세포밀도, 분석기간 및 발색을 이용한 측정방법(colorimetric assay) 등의 차이라고 생각된다.

교정적 치아이동시 즉 교정력에 의한 기계적 자극이 치주조직에 손상을 가하면 세포막으로 부터 prostaglandin의 합성과 분비가 유도되어 세포내 cyclic AMP와 Ca^{++}이 증가됨으로써 파골세포의 활성도가 높아지고 이에 따라 골흡수가 야기되어 치아이동이 이루어 진다[63]. 이러한 골흡수는 골조직의 유기성분 및 무기성분의 세포의 분해과정이며 이들 분해효소 및 유기산이 세포밖으로의 유리가 선행되어야 한다[64,65].

LPS는 출혈성괴사, 혈소판응집, 대식세포 출현유도, 보체활성화와 함께 다양한 생물학적 역할및 세포와 조직의 파괴를 일으키는 물질로 알려져 있다[29,30]. 이러한 LPS는 실험동물에 투여할 경우 여러가지 독성작용 이외에 다양한 약리학적, 병리학적 및 면역학적 작용을 나타내며 치조골 흡수를 유도할 수 있고 이때 lipid A 부분이 일시적으로 관여하는 것으로 알려져 있다[66].

Hausman등[66]은 LPS가 치조골의 흡수를 유도하며 LPS의 polysaccaride 부분이 alternative pathway의 활성화에 필수적이며 면역체계에서 세균의 인지는 주로 LPS에 대한 항체형성을 하는 것으로 보아 LPS는 표면항체로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔으며[29], Meryon[67]에 의하면 LPS에 의해 유도된 골흡수는 prostaglandin에 의해 변화된다고 하였고 LPS는 용해소체효소의 유리를 증가시킬 뿐 아니라 교원분해효소의 활성을 증가시키는 것으로 보이며 LPS의 치조골흡수는 파골세포를 활성화시킴으로써 이루어진다고 하였다.

Hausman[31]은 골흡수 촉진물질로 알려진 LPS에 의한 골흡수 영향을 평가하기 위하여 골조직 장기 배양시 배양액 내에 1μg/ml의 LPS를 첨가한 경우 48시간 및 72시간에 골흡수 촉진 효과를 관찰할 수 있었고 10μg/ml의 LPS를 첨가한 경우에는 배양 72시간에 골흡수가 증가되었다고 하였다. 본 연구에서는 LPS 농도에 따라 5μg/ml 및 0. 5μg/ml의 경우 세포증식 억제효과는 시간경과에 따라 1, 2일째군에서는 차이가 없었으나 3일째에서는 약 20%의 세포증식억제를 보여 LPS 10 μg/ml의 농도에서 50%의 증식억제 효과가 있다는 Layman과 Diedrich[68]의 결과와는 약간 차이가 있었다.

LPS 0.5μg/ml 농도에 PDGF를 동시에 투여한 경우 배양 1, 2일째에는 대조군과 차이가 없었으나 배양 3일째의 PDGF 1ng/ml에서 LPS 단독투여시보다 활성이 증가되었고, 10ng/ml에서는 대조군 및 LPS투여군보다 유의한 세포활성 증가가 있었다($p<0.05$). 또한 LPS 5μg/ml 농도에 PDGF를 동시에 가한 경우 배양 1일째에는 대조군과 차이가 없었으나 배양 2일째 PDGF 10ng/ml 의 농도에서는 LPS 단독투여 및 대조군보다 높은 활성을 보였다. LPS 5μg/ml 농도에 PDGF를 동시에 가한 배양 3일째에는 0.1ng/ml 에서는 대조군과 차이가 없었으나 PDGF 1ng은 LPS단독투여군보다 높은 활성을 보였고 PDGF 10ng/ml에서는 LPS 단독투여및 대조군보다 높은 활성을 보였으며 통계학적 유의성이 있었다($p<0.05$). 따라서 배양기간 및 PDGF농도가 증가함에 따라 세포활성도가 증가하였다. 그러나 PDGF 0.1ng/ml 농도에서는 LPS 투여 후 활성이 오히려 감소하여 교정력에 의한 치아의 이동에서 PDGF와 LPS같은 국소조절물질의 상호작용이 골개조과정에서 치주인대세포의 활성 및 억제에 작용한다고 생각된다.

골흡수 및 조골세포증식을 이해하기 위해 치주인대로부터 형성되는 C-AMP의 합성량, 교원질합성능, 교원질유형, alkaline phosphatase 활성도 등에 대한 연구가 향후 필요하며 prostaglandin 등이 합성되어 유

리되는 물질들 중 interleukin-1, TNF, TGF, FGF 등의 골개조에 관련된 물질들 간의 상호작용 및 생물학적 작용을 분석함으로써 교정치료에서 치주인대의 역할 및 생물학적 중요성을 규명해야 한다고 생각된다.

V. 결 론

골흡수 조절물질로 알려진 LPS와 성장 촉진 인자인 PDGF가 치주인대세포에 미치는 영향에 관해 알아보고자 사람 치주인대세포를 채취 배양하며 LPS와 PDGF를 적용하여 치주인대세포의 형태 및 세포활성도의 변화를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PDGF를 단독으로 가한 경우 0.1ng/ml에서는 세포활성이 대조군과 차이가 없었으나 1ng/ml에서는 배양 2일째에, 10ng/ml에서는 배양 2, 3일째에 유의한 세포활성 증가를 보였다.
2. LPS 단독처리시 0.5μg/ml 및 5μg/ml 농도에서 배양 1일째, 2일째에는 대조군과 차이가 없었으나 배양 3일째에 유의한 활성 감소가 있었다.
3. 0.5μg/ml 및 5μg/ml 농도의 LPS에 1ng/ml 및 10ng/ml 농도의 PDGF 첨가시, 배양 3일째에 LPS 단독투여시보다 유의한 세포활성 증가가 있었으며 특히 10ng/ml PDGF 첨가시에는 대조군보다도 활성이 컸다.

이상과 같은 연구결과로, 골개조 과정에 관여하는 것으로 여겨지는 치주인대세포에 대한 적절한 농도의 PDGF와 LPS의 복합투여는 PDGF 단독투여 못지 않게 치주인대세포의 활성을 증가시키는 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Kahn AJ, Partridge NC: New concepts in bone remodeling: An expanding role for the osteoblast. Am J Otolaryngol, 8:258-261, 1987.
2. Reitan K: Tissue rearrangement during retention of orthodontically rotated teeth. Angle Orthod, 29;105-113, 1959.
3. Martin TJ, Ng KW, Suda T: Bone cell physiology. Endocrinol Met Clin Am, 18:833-858, 1989.
4. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JHM: Cell of bones: Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. Physiol Rev, 66:855-886, 1986.
5. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M: The role of growth factors in skeletal remodeling. Endocrin Metabol Clin Am, 18:903-908, 1989.
6. Terranova VP, Wikesjö UME: Extracellular matrix and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium. J Periodontol, 58:371-380, 1987.
7. Fraves DT, Cochran DL: Mesenchymal cell growth factors. Crit Rev Oral Biol Med, 1:17-36, 1990.
8. Antoniades HN, Owen AJ: Growth factors and regulation of cell growth. Annu Rev Med, 33:445-463, 1982.
9. Hintz RL, Liu J: Demonstration of specific plasma protein binding sites for sonatomedin. J Clin Endocriol Metab, 45: 988-995, 1977.
10. Antoniades HN, Hunkapiller MW: Human platelet-derived growth factor(PDGF): amino terminal amino acid sequence. Science, 220: 963-965, 1983.
11. Hmmacher A, Hellman U, Johnsson A: A major part of PDGF purified from human platelet is a heterodymer of one A and one B chain. J Biol Chem, 263:16493-16498, 1988.
12. Hawiger J: Platelet secretory pathway: An overview. Method in Enzyme, 169:191-195, 1989.
13. Rapploee DA, Mark D, Band MJ: Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis of mRNA phenotying. Science, 241:707-712, 1988.
14. Antoniades HN, Galanopoulas T, Neville GT: Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor(PDGF) and PDGF receptor in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblast. Proc Natl Acad Sci USA, 88:565, 1991.
15. Sitarus NM, Sariban E, Pantagis P: Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor(PDGF) and synthesive PDGF-like mitogen. J Cell Physiol, 132:376-380, 1987.
16. Hauschka PC, Mavrakos AE, lafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M: Growth factors in bone matrix. J Biol Chem, 261:12665-12674, 1986.
17. Piche JE, Graves DT: Study of the growth factor requirement of human bone-derived cells: A comparision with human fibroblasts. Bone, 10: 131-138, 1989.
18. Rutherford RB, Trilsnith MD, Ruan ME, Charette MF: Synergistic effects of dexamethasome on platelet-derived growth factor mitogenesis in vitro. Arch Oral Biol, 37: 139-145, 1992.
19. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RV, Antoniades HN: Role of platelet-derived growth factor in woumd healing: synergistic effects with other growth factors. Proc Natl Acad Sci USA, 84:7696-7700, 1987.
20. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN: Growth factors in wound healing: Single and synergistic effects on partial thichness pork skin wounds. J Clin Invest, 84:640-646, 1989.
21. Lynch SE, Willians RC, Polson AM, Howell TH, Zappa UE, Antoniades HN: A combination of platelet derived and Insulin-like Growth Factors enhances periodontal regeneration. J Clin Periodontol, 16:545-548, 1989.

22. Pierrie GF, Mustae TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF: Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-β enhance tssue repair activities by unique mechanisms. J Biol Chem, 109:429-440, 1989.
23. Lynch SE, Castilla GR, Williams RC: Combination of platelet -derived and Insulin-like growth factors on periodontal wound healing. J Periodontol, 62:458-467, 1991
24. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA: Insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. J Periodontol, 62:710-718, 1991
25. Scherp HW: Disscussion of bacterial factors in periodontal disease. J Dent Res, 41: 327-330, 1962.
26. Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhangen SE: None resorbing activity in supernatant fluid form human peripheral block leukocytes. Science, 177:793-794, 1972
27. Rizzo AA, Mergenhagen SE: Histologic effects of endotoxin injected into rabbit oral muxosa. Arch Oral Biol, 9:659-670, 1964.
28. Crutchley MJ, March DG, Cameron J: Free endotoxin. Nature, 204:1502, 1967.
29. Morrision DC, Ulevitch RJ: A Review; the interaction of bacterial endotoxins with cellular and humoral mediation system. Am J Path, 93:527-618, 1978.
30. Socrnasky S. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res, 49: 203-222, 1970.
31. Hausmann E: Endotoxin stimulation of bone resorption in tissue culture. Calcif Tissue Res, 9:272-276, 1972.
32. Kelley P, Jolt SC: Characterization of the lipopolysaccharide from Actinobacilus actionomycetemconitans Y-4 and N-27. Infection and Immunity, 30:862-866, 1980.
33. Raisz LG, NukiK, Cynthia B, Craig RG: Interactions between bacteral products, muramyl dipeptide and endotoxin on bone resorption in organ culture. Calcif Tissue Int, 34:365, 1982.
34. Raisz LG, Nuki K, Cynthia B, Craig RG: Interactions between bacteral endotoxin and other stimulators of bone resorption in organ culture. J Periodon Res, 16:1-7, 1981.
35. Raisz RZ: Hormonal regulation of bone growth and remodeling. Ciba Foundation Symposium, 136:226-238, 1988.
36. Heuttner RJ, Whitman CL: Tissue changes occuring in thr Macaque Rhesus monkey during orthodontic movement. Am J Orthod, 44:328-345, 1958.
37. Gould TRL, Melcher AH, Brunette DM: Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. J Periodont Res, 15 :20-42, 1980.
38. McCulloch CAG, Nementh E, Lowenberg B, Melcher AH: Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. Ant Rec, 219: 233-242, 1987.
39. Davison L, McCulloch CAG: Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations. J Periodont Res, 21:414-428, 1986.
40. Aukhil I, Simpson DM, Suggs C, Petterson E: In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament.: An experimental study using physical barriers. J Clin Periodontol, 13:862-868, 1986.
41. Maeder CL, Carnes DL, Graves DT: Alkaline phosphatase and osteocalcin levels in cells from periodontal explants. J Dent Res, 67:232 Abst. No.958, 1988.
42. Piche JE, Carnes JDL, Graves DT: Initial characterization of cells derived from human periodontia. J Dent Res, 68:761-767, 1989.
43. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF: The biology of platelet-derived growth factor. Cell, 46: 155-169, 1986.
44. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L: A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Pro Nat Acad Sci USA, 71:1207-1210, 1974.
45. Kohler N, Lipton A: Platelets as a source of fibroblast growth promoting activity. Exp Cell Res, 87: 297-301, 1974.
46. Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD: Purification of human platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA, 76:1809-1813, 1979.
47. Raines EW, Ross R: Purification of human platelet-derived growth factor. Methods in Enzyme, 109:749-773, 1985.
48. Heldin CH, Wasteson A, Westermark B: Platelet-derived growth factor. Molec and Cell Endocrin, 39:169-187, 1985.
49. Ross R, Vogel A: The platelet-derived growth factors. Cell, 14:203-210, 1978.
50. Ross R: Platelet-derived growth factors. Lancet, 27: 1179-1182, 1989.
51. Brown GL: Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. N Engl J Med, 321: 76-79, 1989.
52. Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray NJ, Ross R: PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. Am J Path, 136:1235-1246, 1990.
53. Schwartz SM, Foy L, Bowen-Pope DF, Ross R: Derivation and properties of platelet-derived growth factor-independent at smooth muscle cells. Am J Pathol, 136:1417-1428, 1990
54. Sprugel KH, Mcpherson JM, Clowes AW, Ross R: Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. Am J Pathol, 129:601-613, 1987.
55. Sprugel KH: PDGF and impaired wound healing. Prog Clin Biol Res, 365:327-340, 1991.
56. Canalis E: Effect of platelet-derived growth factors on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. Metabolism, 30:870-975, 1981.
57. Matsuda N, Lin WL, Kumr NM, Cho MI, Genco RJ: Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors

in vitro. J Periodontol, 63:515-525, 1992.
58. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL: Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. J Periodontol, 64:142-148, 1993.
59. Nister M, Hammacher A, Mellstrom K, Siegbahn A, Ronnstrnd A, Westermark B, Heldin CH: A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activites than a PDGF-AB heterodimer from human platelets. Cell, 52:791-803, 1988.
60. Kazlauskas A, Bowen-Pope D, Seifert R, Hartc CE, Cooper JA: Different Effects of homo and heterodimers of platelet-derived growth factor and chains on human and mouse fibroblasts. EMBO J, 7:3727-3731, 1988.
61. Ramakrishnan PR, Cho MI: Identifiction of platelet-derived growth factor receptors on periodontal ligament cells. J Dent Res, 71: 176 Abst No. 563, 1992.
62. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M: Effects of platelet-deried growth factor on bone formation in vitro. J Cell Physiol, 140: 530-537, 1989.
63. Yamaki K: The role of cyclic AMP, calcium and prostaglin dins in the induction of osteclastic bone resorption associated with experimental tooth movement. J Dent Res, 62:877-881, 1983.
64. Vaes G: On the mechanism of bone resorption, The action of parathroid hormone on the secretion and synthesis of lysosomal enzymes and on the extracellular release of acid by cells, J Cells Biol, 39:676-697, 1968.
65. Vaes G, Jacques P: Studies on bone enzymes: distribution of acid hydrolases, alkaline phenylphosphatease. cytochrome oxidase and catalase in subcellular fraction of bone tissue homogenates. Biochem J, 97:389-394, 1965
66. Hausmann E, Luderitz O, Knox K, Weinfeld N: Structural requirement for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. J Dent Res, Special Issue. B. p94-p99, 1975.
67. Meryon SD, Peris AD: Lipopolysaccharide induced bone resoprtion is mediated by prostaglandins. Life Science, 28; 1061-1065, 1985
68. Layman DL, Dietich DI: Growth inhibitory effects of endotoxins from Bcteriodes gingivalis and intermedius on human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol, 58;387-392, 1978

- ABSTRACT -

The Effects of PDGF and LPS on the Viability of Human Periodontal Ligament Cells

Jeong Heo, D.D.S., M.S.D., Jeong-Hyun Lim, D.D.S., M.S.D., **Sang-Cheol Kim**, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Orthodontics, Collage of Dentistry, Wonkwang University

Platelet-derived growth factor(PDGF) and lipopolysaccharide(LPS) may be the important regualtors of bone metabolism. Exogenous PDGF is recognized to have a stimulating effect on bone resorption in organ culture, but to stimulate the formation of new bone ultimately. LPS is known to be a stimulating agent on the osteoclastic activity.

The purpose of this study was to evaluate the effects and the interaction of PDGF and LPS on periodontal ligament(PDL) cells which have important roles in bone remodeling.

Cultured human periodontal ligament cells were treated with various concentration of PDGF and/or LPS. The cellular viability was measured by Microtitration(MTT) assay according to the lapse time of culture.

The obtained results were as follows:

1. The viability of PDL cells was not different from the control in 0.1ng/ml of PDGF, but was significantly increased to be over the level of control in 1ng/ml of PDGF at the second day of culture, and in 10ng/ml of PDGF at the second and the third day of culture.
2. The cellular viability was decreased in 0.5μg/ml or 5μg/ml of LPS at the third day of culture.

3. Incubation with both 1ng/ml or 10ng/ml of PDGF and 0.5μg/ml or 5μg/ml of LPS resulted in the increased cellular viability at the third day, which was greater than LPS only treated group. It was greater than even the control group in 10ng/ml of PDGF.

From the above findings, we could summarize that the admixture of PDGF and LPS could not less increase the viability of the human periodontal ligament cells than PDGF only.

KOREA. J. ORTHOD. 1998 ; 28 : 143-153

※ **Key words** : PDGF, LPS, BONE REMODELING