

Vitamin D₃ 와 TGF- β 가 치주인대세포 활성에 미치는 영향에 관한 연구

송 현 섭¹⁾ · 김 상 철²⁾

골 성장 및 개조에 관여하는 전신적 조절인자인 1,25-(OH)₂D₃와 국소적 조절인자인 TGF- β 가 사람의 치주인대세포 기능에 미치는 영향을 관찰하고자 그 인자들을 단독 혹은 복합적으로 치주인대세포에 가하여 그 활성 변화를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 10ng/ml 농도의 vitamin D₃를 치주인대세포에 가한 후 배양 1, 2, 3일째의 활성은 대조군과 차이가 없었으나, 50ng/ml 농도로 가한 후 배양 3일째에는 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 100ng/ml 농도에서는 배양 1, 2, 3일째에 유의하게 증가하였다.
2. 0.1ng/ml 농도의 TGF- β 를 치주인대세포에 가한 후 배양 1, 2, 3일째의 활성은 대조군과 유의한 차이가 없었으나, 1ng/ml나 5ng/ml 농도의 TGF- β 를 가한 경우 배양 3일째에 유의하게 증가되었으며 10ng/ml 농도의 경우에는 배양 2, 3일째에 유의하게 증가하였다.
3. 1ng/ml 농도의 TGF- β 와 다양한 농도의 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 100ng/ml 농도의 vitamin D₃로 배양 3일째에 유의한 활성 증가를 볼 수 있었다.
4. 5ng/ml 농도의 TGF- β 와 다양한 농도의 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 10, 50, 100ng/ml의 vitamin D₃에서 공히 배양 2일째부터 유의한 활성 증가를 보였으나 10ng/ml에서는 배양 3일째에 그 활성이 유지되지 못하였다.
5. 10ng/ml 농도의 TGF- β 와 다양한 농도의 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 50ng/ml의 vitamin D₃에서는 배양 2일째부터 100ng/ml의 vitamin D₃에서는 1일째부터 유의한 활성 증가를 보였다.

(주요단어 : 치주인대세포, vitamin D₃, TGF- β)

I. 서 론

골조직은 세포외기질과 여러 종류의 세포들을 포함하고 있는 복잡한 조직으로서 일생동안 흡수와 신생이 계속적으로 일어나는 동적인 조직이다¹⁾. 교정치료시 치아의 이동은 치주인대세포를 매개로 골조직의 개조(bone remodeling)가 일어나는 과정으로서, 교정력이 어떻게 전달되어 골개조라는 결과로 나타나는지에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않으나, 골

개조의 과정에 관여하는 세포들 즉, 조골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성에 영향을 미치는 여러가지 호르몬 등과 같은 전신적 인자와 cytokine과 같은 국소적 인자에 의하여 조절되고 있다^{2,3)}.

골개조와 성장에 관여하는 전신적 인자로는 parathyroid hormone(PTH), 1,25 dihydroxycholecalciferol(1,25-(OH)₂D₃), calcitonin, estrogen 및 glucocorticoid 등과 같은 호르몬이 있다^{4,5)}. 그 중 1,25-(OH)₂D₃는 vitamin D₃가 두 단계의 하이드록시화(hydroxylation)를 거쳐 생성된 대사물질로서 혈청과

¹⁾ 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 박사과정

²⁾ 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 교수

세포외액의 Ca^{2+} 과 HPO_4^{2-} 의 적절한 농도를 유지하게 함으로서 정상적인 골형성이 일어나도록 유도하는 호르몬이다⁶⁾. 이는 또한 장에서 칼슘과 인의 흡수를 촉진시켜 골흡수가 증가되며 그 결과로 골형성이 억제된다고 Raisz⁷⁾가 보고하였다. Collins와 Sinclair⁸⁾는 교정적 치아이동시 백서의 치근막내에 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 를 국소적 투여한 결과 압박측에서 치조골 흡수가 많아지는 것을 관찰하고 교정적 치아이동에서의 임상적 적용 가능성을 제시하였다. 그러나 Beresford등⁹⁾은 사람의 골세포에서 제1형 교원질과 alkaline phosphatase(ALP) 활성을 강력하게 증가시킨다고 하였으며, Endo등¹⁰⁾은 in vitro에서 골형성을 촉진한다고 하여 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 의 효과에 대하여 상반된 보고를 하였다.

골조직의 성장과 개조에 관여하는 국소적 조절물질은 대부분 성장인자로서, 골세포에 의하여 생성되고 골기질에서 발견되며, autocrine action 또는 paracrine action으로 그 조절기능을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 국소적 조절인자에는 platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor(FGF), transforming growth factor(TGF), insulin-like factor, interleukin-1등이 있다.

그 중 TGF- β 는 여러 종류의 세포의 증식과 분화에 관여하는 multifunctional peptide로서 특히 골조직에서 그 생성량이 많은 것으로 보고되고 있다^{11,12)}. TGF는 바이러스에 의해 유도된 생쥐 종양세포의 조건 배지에서 최초로 발견된 펩티드이며¹³⁾, 정상 및 종양세포로부터 생성되어 정상세포의 형질을 전환시키는 물질로 알려져 있다. 즉 TGF는 단층세포 배양시 정상세포 성장의 밀도의존성 억제를 소실시키고 과성장을 야기하며, 세포 형태의 변화를 유발하고, anchorage dependency의 소실에 따라 soft agar상에서 세포집락이 형성되도록 하는 등 다양한 표현형 전환을 일으킨다¹⁴⁾. 이러한 TGF는 epidermal growth factor(EGF) 수용체에 대한 작용과 관련하여 TGF- α 와 TGF- β 로 분류되고 있다¹⁵⁾. 분자량 5,700정도의 단량체 펩티드로 EGF와 구조적 유사성을 갖고 EGF 수용체에 경쟁적으로 결합하며 soft agar상에서 단독으로 NRK-49F 세포의 작은 세포집락을 형성하는 것으로 알려진 TGF- α 와는 달리, TGF- β 는 분자량 12,500정도인 2개의 단량체가 이황화물 결합에 의해 결합된 이량체 펩티드로서, EGF 수용체에 결합하지 않고 단독으로는 세포집락을 형성하지 못하나 EGF나 TGF- α 가 같이 존재하는 경우에는 NRK-

49F 세포의 큰 세포집락을 형성하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

TGF- β 는 세포의 복제와 분화에 주요한 조절인자로서, 세포성장을 촉진하거나 억제하는데^{16,17)}, Spron등¹⁸⁾은 TGF- β 의 역할에 대하여 상피세포의 증식을 억제하고 간엽세포의 증식을 촉진한다고 하였으며, Postlethwaite등¹⁹⁾은 섬유모세포의 화학주성과 증식을 자극한다고 하였고, Ihnorz와 Massague²⁰⁾는 대부분의 배양계에서 세포외기질의 생성을 유도한다고 보고한 바 있다. TGF- β 는 in vitro에서 배양 조건에 따라 조골세포의 증식에 촉진적 역할²¹⁻²⁵⁾과 억제적 역할^{26,27)}의 양면적 기능을 가진다. 또한 TGF- β 는 PDGF, TGF- α , EGF, FGF와 같은 국소조절인자들로 하여금 그들의 세포반응을 선택하게 하거나²⁸⁾ 발현을 촉진시키는 것과 같은²⁹⁾ 조절기능이 있다. 또한 TGF- β 는 백서 두개관의 장기배양시 조골세포가 풍부한 백서태자골 세포군의 배지에서 발견되어 조골세포가 이 peptide를 합성, 분비하고 스스로 반응하는 autocrine action을 하는 것으로 추측된다³⁰⁻³²⁾. 또한 골흡수 촉진 호르몬인 부갑상선호르몬, 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ 와 골흡수 억제 호르몬인 calcitonin에 의해 조절되어 골기질로부터 TGF- β 유리가 증가 또는 감소되며³³⁾ 잠재형으로 존재하는 TGF- β 가 파골세포에 의해 활성화될 뿐 아니라³⁴⁾ TGF- β 에 의해 백서태자 장골의 흡수가 억제됨이 밝혀진 바 있어³⁵⁾ 골흡수와 골형성을 연결하는 연결인자로 작용할 가능성이 높을 것으로 생각되고 있다.

Reitan¹⁾과 Rygh³⁶⁾는 교정력에 의한 치아 이동시 치조골의 변화에 대한 조직학적 고찰을 통하여, 교정력은 치주인대를 통하여 전달되므로 치주인대세포 및 그 주위에 존재하는 세포들을 잘 관찰하는 것이 치아의 이동 기전에 관한 의문을 해결할 수 있는 방법으로 제시한 바 있으며, Roberts등³⁷⁾은 치아이동이란 결국 치주인대에 존재하는 전구세포가 활성화되고 증식, 분화하여 골 재형성에 직접 관여하여 이루어지는 것이기 때문에 교정력에 의한 골개조 과정에서의 치주인대세포의 중심적 역할을 강조한 바 있다. 이에 본 연구는 골성장 및 개조에 관여하는 전신적 조절인자인 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 나 국소적 조절인자인 TGF- β 가 치주인대세포의 기능에 미치는 영향을 관찰하고자 그 인자들을 단독 혹은 복합적으로 치주인대세포에 가하여 그 활성의 변화를 측정해 보아 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 사람 치주인대세포

본 실험에 사용된 세포는, 원광대학교 치과대학 부속 치과병원 교정과에 내원하여 상하악 제1소구치 발거를 요하는 환자로서 전신 질환이 없고, 건강이 양호하며, 임상적으로 치주질환이 없다고 판정된 환자의 치아를 발거, 채득하여 초기배양 후 계대배양을 통하여 얻은 치주인대세포를 사용하였다. 치아를 발거하기 1주일 전부터 환자에게 잇솔질을 잘 하도록 하고, 클로르헥사메드(부광약품)로 양치하도록 권유한 후, 치주인대세포를 무균상태로 분리하기 위하여 발거된 치아를 penicillin, streptomycin(Gibco co.) 및 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco co.)이 첨가된 minimum essential medium(MEM, Gibco co.)으로 3-4회 세척한 후 curette을 이용하여 치주인대를 채득하였다. 10% FBS가 첨가된 α-MEM이 들어있는 60mm culture dish(Corning co.)에 위치시킨 후 37°C에서 95% 습도를 유지하면서 5% CO₂가 함유된 CO₂ incubator 에서 배양하였다. 10% FBS가 첨가된 MEM을 매일 교환하며 위상차현미경을 사용하여 배양조직으로부터 치주인대세포가 조직 외부로 자라나 오는 것을 관찰한 후 0.5% trypsin과 5.3mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA, Gibco co.)로 세포균을 떼어내어 3000rpm으로 4°C에서 10분간 원심 분리하여 세포를 수집한 후 Hanks's balanced salt solution(HBSS, Gibco co.)을 사용하여 2-3회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 MEM에서 35mm 배양접시에 계대배양을 시행하였다.

2) vitamin D₃ (1,25-dihydroxycholecalciferol: [1,25-(OH)₂D₃]): (Calbiochem co., USA) 10, 50, 100ng/ml의 농도로 준비하였다⁹⁾.

3) TGF-β: (Gibco co., human, recombinant) 0.1, 1, 5, 10ng/ml의 농도로 준비하였다³⁸⁾.

2. 연구방법

1) 실험군의 설정

아래와 같이 5가지의 실험군을 설정하였다.
가. vitamin D₃ 단독투여(10, 50, 100ng/ml의 농도),
나. TGF-β 단독투여(0.1, 1, 5, 10ng/ml의 농도)

다. 1ng/ml TGF-β와 10, 50, 100ng/ml의 vitamin D₃ 혼합투여

라. 5ng/ml TGF-β와 10, 50, 100ng/ml의 vitamin D₃ 혼합투여

마. 10ng/ml TGF-β와 10, 50, 100ng/ml의 vitamin D₃ 혼합투여

2) 치주인대 세포활성 측정

계대배양한 치주인대세포를 선택하여 실험 전일 분주한 다음 1일간 배양하고 실험군 설정에 따라 10, 50, 100ng/ml 농도의 1,25-(OH)₂D₃와 0.1, 1, 5, 10ng/ml 농도의 TGF-β를 각각 가하여 1일, 2일 그리고 3일간 배양하였다. 세포활성도를 측정하기 위하여 생리식염수에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co., USA)용액 200μl를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양한 후 MTT용액을 버리고 dimethyl sulfoxide((CH₃)₂SO, DMSO)를 200μl씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate상으로 옮겼다. plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣고 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 대조군에 대한 백분율로 세포활성도를 산출하였다.

3) 통계분석

vitamin D₃와 TGF-β의 농도와 배양 시간경과에 따라 대조군에 대한 백분율로 세포활성도를 측정하여 그 평균과 표준편차를 구하였고 일원분산분석법(A-NOVA)를 이용하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

III. 연구성적

1. vitamin D₃ 가 치주인대세포 활성에 미치는 영향

배양 1일째에 10ng/ml 농도의 vitamin D₃ 첨가시 96.87±4.04%, 50ng/ml 농도에서는 106.42±4.18%, 100ng/ml에서는 127.88±1.99%로 100ng/ml 농도에서만 대조군에 비해 유의한 활성증가를 보였다(P<0.05). 배양 2일째에도 10ng/ml 농도에서는 99.90±9.85%, 50ng/ml 농도에서 102.68±9.60%로 대조군과 차이가 없었으나 100ng/ml 농도에서만 122.14±1.00%로 대조군과 비교해 유의한 차이를 보여(P<0.05), 농도의 증가에 따라 세포활성이 증가하는 경향을 보였다. 배양



Fig. 1. 10ng/ml of TGF- β at 1-day after cultivation. (X100)



Fig. 2. 100ng/ml of Vitamin D₃ at 1-day after cultivation. (X100)



Fig. 3. 10ng/ml of TGF- β & 10ng/ml of vitamin D₃ at 1-day after cultivation. (X100)



Fig. 4. 5ng/ml of TGF- β & 50ng/ml of vitamin D₃ at 2-day after cultivation. (X100)



Fig. 5. 5ng/ml of TGF- β & 100ng/ml of vitamin D₃ at 3-day after cultivation. (X100)

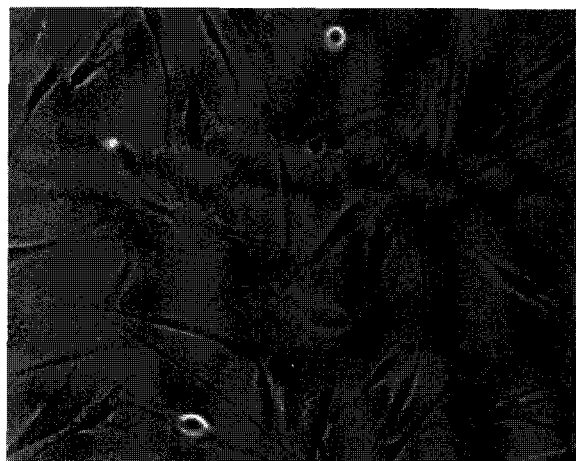


Fig. 6. 10ng/ml of TGF- β & 100ng/ml of vitamin D₃ at 3-day after cultivation. (X100)

3일째에는 50ng/ml 농도와 100ng/ml 농도에서 각각 126.58±4.44%, 146.42±12.57%로 유의한 세포활성 증가를 보였다(P<0.05)(Table 1).

2. TGF-β가 치주인대세포활성에 미치는 영향

배양 1일째에 0.1ng/ml 농도의 TGF-β 첨가시 98.82±5.95%로 활성감소를 보이는 반면, 1ng/ml 농도에서는 105.74±4.13%, 5ng/ml 농도에서는 111.20±3.04%, 10ng/ml 농도에서는 113.43±4.58%로 농도와 관련없이 치주인대세포의 활성은 대조군과 유의한 차이가 없었다.

배양 2일째에는 0.1ng/ml 농도에서 98.50±2.83%로 감소를 보였으나, 1ng/ml 농도에서는 104.71±7.71%, 5ng/ml 농도에서는 103.28±5.09%로 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 경향을 보였으나 10ng/ml 농도에서만 대조군과 비교해 유의한 차이가 있었다(P<0.05).

배양 3일째에는 0.1ng/ml 농도에서 113.38±8.14%로 대조군과 차이가 없었으나 1ng/ml 농도에서는 157.95±31.75%, 5ng/ml 농도에서는 181.22±17.98%, 10ng/ml 농도에서는 184.52±77.78%로 유의하게 활성이 증가되었다(P<0.05) (Table 2).

3. TGF-β와 vitamin D₃ 혼합투여가 치주인대세포 활성에 미치는 영향

1ng/ml의 TGF-β와 다양한 농도의 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 배양 1일째에는 10ng/ml 농도의 vitamin D₃에서 100.81±4.43%, 50ng/ml에서는 100.52±1.80%, 100ng/ml에서는 111.17±2.61%로 대조군과 별 차이가 없었다.

배양 2일째에도 10ng/ml의 vitamin D₃에서 94.54±7.71%, 50ng/ml에서 101.37±4.06%로 차이가 없었고 100ng/ml에서만 118.91±9.70%로 증가하였으나 유의성은 없었다.

배양 3일째에서도 10ng/ml의 vitamin D₃에서 117.35±6.41%, 50ng/ml에서는 121.43±9.96%로 증가하였으나 유의성은 없었는데 100ng/ml에서는 129.11±9.19%로 유의한 활성증가를 보였다(P<0.05)(Table 3).

5ng/ml 농도의 TGF-β에 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 배양 1일째에는 10ng/ml의 vitamin D₃에서 94.93±5.94%, 50ng/ml에서는 92.84±2.35%로 약간 감소하였고 100ng/ml에서는 112.22±5.83%로 약간 증가

Table 1. The Effects of Vitamin D₃ on the Viability of Cultured Periodontal Ligament Cells (% , mean ± S.D.)

	1-day	2-day	3-day
control	100.00±4.12	100.00±8.30	100.00±5.82
10ng/ml	96.87±4.04	99.90±9.85	117.71±6.14
50ng/ml	106.42±4.18	102.68±9.60	126.58±4.44*
100ng/ml	127.88±1.99*	122.14±1.00*	146.42±12.57*

* : different from control, p<0.05

Table 2. The Effects of TGF-β on the Viability of Cultured Periodontal Ligament Cells (% , mean ± S.D.)

	1-day	2-day	3-day
control	100.00±4.92	100.00±8.63	100.00± 8.31
0.1ng/ml	98.82±5.95	98.50±2.83	113.38± 8.14
1ng/ml	105.74±4.13	104.71±7.71	157.95±31.75*
5ng/ml	111.20±3.04	103.28±5.09	181.22±17.98*
10ng/ml	113.43±4.58	130.38±7.41*	184.52±77.78*

* : different from control, p<0.05

하였지만 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

배양 2일째에는 10ng/ml의 vitamin D₃에서 135.108±4.63%, 50ng/ml에서는 159.22±18.74%, 100ng/ml에서는 160.19±15.19%로 농도가 증가함에 따라 세포활성도가 유의하게 증가하였다(P<0.05).

배양 3일째에는 10ng/ml의 vitamin D₃에서 117.22±2.40%로 약간 증가하였으나 50ng/ml에서 121.40±9.66%, 100ng/ml에서는 122.29±3.05%로 유의하게 증가하였다. 그러나 농도간에 큰 차이는 없었다(Table 4).

10ng/ml 농도의 TGF-β에 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 배양 1일째에는 vitamin D₃ 농도가 10, 50ng/ml인 경우에 활성도가 각각 92.84±8.23%, 106.68±9.60%로 대조군과 큰 차이가 없었고 10ng/ml의 TGF-β 단독투여군에 비해 약간 감소하였다. 그러나 100ng/ml의 vitamin D₃의 경우 127.88±11.99%로 대조군 및 10ng/ml TGF-β 단독투여군에 비해 유의하게 증가하였다.

배양 2일째 경우에는 10ng/ml vitamin D₃ 투여군은 대조군과 큰 차이가 없었으나 50, 100ng/ml에서는

Table 3. The Effects of Vitamin D₃ and TGF-β (1ng/ml) on the Viability of Cultured Periodontal Ligament cells (%. mean ± S.D)

	1 day	2 day	3 day
control	100.00±4.12	100.00±8.30	100.00±5.82
TGFonly1ng/ml	105.74±4.12	104.21±8.30	157.95±3.28*
TGF+VD310ng/ml	100.81±4.43	94.54±7.71	117.35±6.41
TGF+VD350ng/ml	100.52±1.80	101.37±4.06	121.43±9.96
TGF+VD3100ng/ml	111.17±2.61	118.91±9.70	129.11±9.19*

* : different from control, p<0.05

Table 4. The Effects of Vitamin D₃ & TGF-β (5ng/ml) on the Viability of Cultured Periodontal Ligament Cells (%. mean ± S.D)

	1 day	2 day	3 day
control	100.00±4.12	100.00± 8.30	100.00±5.82
TGFonly5ng/ml	111.20±5.37	103.28± 7.40	181.22±1.84*
TGF+VD310ng/ml	94.93±5.94	135.10± 4.63*	117.22±2.40
TGF+VD350ng/ml	92.84±2.35	159.22±18.74*	121.40±9.66*
TGF+VD3100ng/ml	111.17±2.61	118.91± 9.70	129.11±9.19*

* : different from control, p<0.05

Table 5. The Effects of Vitamin D₃ & TGF-β (10ng/ml) on the Viability of Cultured Periodontal Ligament Cells (%. mean ± S.D)

	1 day	2 day	3 day
control	100.00± 4.12	100.00±8.30	100.00±5.82
TGFonly10ng/ml	113.43± 5.12	130.38±7.41*	184.52±7.82*
TGF+VD310ng/ml	92.84± 8.23	115.18±8.46	122.14±2.14
TGF+VD350ng/ml	106.68± 9.60	149.43±3.08*	124.57±3.76*
TGF+VD3100ng/ml	127.88±11.99*	161.75±8.90*	144.99±9.80*

* : different from control, p<0.05

149.43±3.08%, 161.75±8.90%로 대조군 및 10ng/ml TGF-β 단독투여군에 비해 유의하게 세포활성도가 증가되었다(P<0.05).

배양 3일째에는 vitamin D₃ 농도가 10, 50ng/ml에서 122.14±2.14%, 124.57±3.76%로 약간 증가하였지만 100ng/ml 농도의 경우 144.99±9.80%로 활성증가가 유지되었다(Table 5, Fig. 5).

IV. 총괄 및 고찰

교정적 치아이동이 일어나는 정확한 세포학적 기

전에 관한 학설로 압력인장설, 혈류장애설, 정수압설 같은 치근막 개념 등이 연구되어왔고, 골개조 과정은 골흡수와 침착을 자극하는 세포에 의해 중재된다고 알려져 있다. 그러나, 기계적인 자극이 골개조하는데 필요한 세포학적 활성으로 전달되는지는 명확하지 않지만, 현재 기계적인 힘만으로 세포활성을 증가시키기보다는 기계적, 화학적, 전기자극을 병행하는 것이 골대사를 빠르게 하여 교정적 치아이동을 빠르게 한다고 Davidovitch등³⁹⁾, Yamasaki등⁴⁰⁾, Stark등⁴¹⁾이 보고하였고 최근 연구는 골개조과정에서 조골세포 또는 파골세포의 역할에 집중되고있다.

골개조 현상은 전적으로 기존의 치조골 자체에만 국한하여 일어나기보다는 치주인대세포가 어떤 역할을 할 것이라는 가정하에 연구가 지속되고 있는데 치주인대는 치은결체조직과는 달리 골형성 능력이 있는 세포들이 잔재해 있을 것으로 생각되어 왔으며, Gould등⁴²⁾은 치주인대 조직내의 혈관 주변에 미분화된 전구세포를 관찰할 수 있다고 하였고, Aukhil등⁴³⁾은 치주인대내에 있는 전구세포는 치아의 상아질과 접촉시 백악아세포와 같은 재생능력이 있는 세포로 분화한다고 하였다. McCulloch등⁴⁴⁾은 [³H]-thymidine을 이용한 자가방사법으로 치주인대내에 존재하는 조골세포와 백악아세포의 전구세포중 적어도 일부는 골내강에서 유래하여 치주인대내로 이주해 간다고 주장하였다. Nojima등⁴⁵⁾은 치주조직과 치주인대세포에서 높은 ALP활성도를 보이며 조골세포로 확인할 수 있는 표지자인 bone gla protein을 치주인대세포가 합성할 수 있는 것으로 보아 치주인대세포는 조골세포나 백악아세포로 분화할 수 있으며 전형적인 조골세포의 표현형을 가지고 있다고 하였다. Somerman등⁴⁶⁾은 치주인대세포를 배양하여 여러 약제에 의한 cyclic-AMP의 양과 단백질 합성능 및 형성되는 단백질 종류에 대하여 실험해 본 결과 치주인대세포는 다소 조골세포와 유사한 양상을 띠고 있으나 전형적인 조골세포의 기능을 하지 않는다고 하여 다소 상반된 견해를 보고한 바도 있다.

vitamin D₃는 cholecalciferol으로도 불리우는 물질로서 음식을 통해서 직접 vitamin D₃가 흡수되기도 하지만 대부분은 7-dehydrocholesterol의 상태로 흡수되어 피부에 운반되면 자외선을 받아 vitamin D₃로 전환된다. vitamin D₃는 간에서 25-hydroxycholecalciferol로 전환되고, 신장을 순환하는 동안에 1,25-dihydroxycholecalciferol, [1,25-(OH)₂D₃]로 전환된다. 신장에서 형성된 1,25-(OH)₂D₃는 매우 생리적으로 활성을 띠는 물질로서 장과 신장에서는 칼슘흡수에 관여하여 체내 Ca²⁺과 HPO₄²⁻를 조절하는 기능을 가진 것으로 알려져 있다^{12,47,48)}. 또한 1,25-(OH)₂D₃는 vitamin D₃의 가장 강력한 대사물질로서 골에서 칼슘과 인의 이동에 중요한 역할을 담당하고 있으며 골세포에서 ALP를 강력하게 자극하는 것으로 알려져 있다²⁾. Beresford등⁹⁾은 사람의 골세포에서 제1형 교원질과 ALP 활성을 증가시키고, Endo등¹⁰⁾은 in vitro에서 골형성을 촉진한다고 하였지만 Chen등⁴⁸⁾은 생쥐와 백서의 골세포 증식에 억제작용하는 것으로, Bikle등⁴⁷⁾은 ALP활성은 1,25-(OH)₂D₃에 의해서 조절되는

데 1,25-(OH)₂D₃가 부족한 경우에는 골기질 합성과 연골성장의 억제와 골형성이 지연된다고 상반된 보고를 하였으며, Erben등¹¹⁾과 Nakamura등⁴⁹⁾은 골세포 분화시에는 생리적인 농도가 중요한데 vitamin D₃ 대사물의 적정농도는 동물모델에서 골소실을 예방할 수 있다고 하였다. 이와같이 1,25-(OH)₂D₃가 골세포에서 매우 다양한 반응을 보이는 것은 실험동물의 species차이와 세포의 기원, 그리고 세포의 밀도와 1,25-(OH)₂D₃ 첨가기간이나 농도 또는 배양세포계의 차이 등에 의한 것으로 생각된다.

인간의 칼슘 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 vitamin D₃는 스테로이드 호르몬으로서 많은 표적세포와 기관에 특이 수용기를 가진다. 특히 골흡수 과정에서 이용될 수 있는 단백질과 효소를 생산하기 위해 표적세포내에 DNA와 RNA를 활성화시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있으며^{50,51)}, 특히 vitamin D의 활성형인 1,25 dihydroxycholecalciferol은 파골세포의 활성화에 가장 잠재력 있는 자극원의 하나로 알려져 있고 혈장내에서 반감기가 2-3시간이지만 세포활성효과는 수일 정도 지속될 수 있다고 한다. 또한 단핵전구세포로부터 파골세포의 형성에 관여 하며 prostaglandin같은 다른 호르몬보다 낮은 농도에서 이런 효과를 발현할 수 있다고 하였다^{52,53)}.

본 실험에서도 배양된 치주인대세포에 vitamin D₃를 첨가하여 치주인대세포의 활성을 관찰한 결과 10ng, 25ng/ml농도의 1,25-(OH)₂D₃는 치주인대세포의 배양 1, 2, 3일 경과군에서 대조군과 활성차이가 없으나, 50ng/ml농도에서는 배양 3일째 치주인대세포의 활성은 통계학적으로 유의하게 증가되었으며 100ng/ml농도에서는 배양 2일, 3일에 유의하게 증가되어 치주인대세포의 vitamin D₃ 농도와 배양기간 증가에 따라 세포활성도가 증가하였다.

vitamin D₃가 치주인대세포의 증식과 표현형 발현을 촉진시켜 골조직 성장 및 개조에 중요한 조절기능을 하는 것으로 생각되나 여러 실험조건에 따라 그 효과가 다양하고 생체에서의 그 역할이 정확히 규명되지 않았기 때문에 이에 대한 vitamin D₃와 제1형 교원질, osteocalcin 활성도에 관한 계속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

골조직대사에는 여러가지 전식적 및 국소적 조절인자들이 관여하고 있으며 특히 국소적 성장인자들이 골조직 성장 및 개조에 더욱 중요한 역할을 할 것으로 여겨져⁵⁴⁾ 최근 이들 국소적 성장인자에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 이중 TGF- β 는 정상세

포의 형질전환을 야기시키는 물질로, 여러종류 세포의 증식, 분화 및 기능을 조절하는 다기능 펩티드로 알려져 있다¹⁵⁾.

거의 모든 조직이 TGF- β 를 합성, 분비하고 TGF- β 수용체를 가지고 있으므로 TGF- β 가 특정 표적세포에만 시기적절하게 작용하기 위해서는 정교한 조절기전에 의해 조절됨이 필요하며 분비된 TGF- β 의 98% 이상이 불활성 형태로 존재하므로, TGF- β 를 조직내에서 국소적으로 활성화시키는 과정을 조절함에 의할 것으로 여겨지고 있다^{55,56)}. TGF- β 의 불활성 형태에 대하여는 여러가지로 보고된 바 있는데, 1) 혈소판에 존재하는 TGF- β 는 TGF- β 동종이량체, 전구체 동종 이량체 및 그에 공유결합된 단일 결합단백질로 이루어져 있고^{57,58)}, 2) Chinese hamster ovary 세포로부터 얻은 재조합 TGF- β 는 TGF- β 동종이량체와 전구체 동종이량체로만 이루어져 있으며⁵⁹⁾, 3) 혈청내에서는 α_2 -macroglobulin과 TGF- β 동종이량체와의 복합체로 존재하는 것으로⁵⁹⁾ 알려져 있다. 한편 다른 조직에서는 큰 분자량의 불활성 TGF- β 가 단일 형태로 존재하는 것으로 보고된 반면, 골조직내에서는 여러가지 형태의 불활성 TGF- β 가 존재하는 것으로 보고된 바 있다⁶¹⁾. 이러한 불활성 형태의 TGF- β 는 산성화, 알칼리화, 단백분해효소 및 plasmin과 Cathepsin D의 첨가등으로 다양한 정도로 활성화됨이 알려져 있다⁵⁶⁾.

TGF- β 는 in vitro에서 osteoblast-like cell의 복제를 자극할 뿐만 아니라 collagen, osteopontin, osteonectin 그리고 alkaline phosphatase(ALP)의 생성을 자극하는 것으로 보고하였지만⁶²⁻⁶⁸⁾, alkaline phosphatase와 osteocalcin은 세포의 증식과 발현을 억제한다는 보고도 있다^{62,69,70)}. 기관배양(organ culture)에서 TGF- β 는 neonatal mouse calvarium의 골흡수를 자극하는 반면에 fetal rat의 장골계(long bone system)에서는 골흡수를 억제하는 것으로 보고되어^{71,72)}, TGF- β 는 실험실의 배양조건에 따라 조골세포 증식을 억제⁷³⁾하거나 자극⁷⁴⁾하는 상반된 효과를 보이고, 이러한 상반된 결과는 TGF- β 의 임상적 적용을 어렵게 한다⁷⁵⁾.

또한 TGF- β 는 다른 PDGF, IGF, FGF등의 polypeptide growth factor와 함께 적용시 상승작용(synergic effects)를 보이는 것으로 알려졌다. Piche 등⁷⁶⁾에 따르면 TGF- β 는 치은 섬유모세포의 증식에 효과가 없었으나 PDGF는 치은과 치주인대 섬유모세포의 증식을 증가시킨다고 보고하였고, Thomas 등⁷⁷⁾

에 따르면 TGF- β 가 PDGF의 반응을 조절하여 치주인대 섬유모세포의 증식을 자극하게 하는 것으로 나타났다.

TGF- β 가 세포에 미치는 영향에 대한 많은 보고가 있었는데, Pfeilschiffer와 Mundy³⁸⁾는 백서의 두개골 배양시 골기질 침착에 대한 TGF- β 의 효과를 평가하였는데, 2.5ng/ml에서 250ng/ml 사이의 농도에서 농도의존형 반응을 보였다고 보고하였고 본 연구에서도 0.1ng/ml 농도의 TGF- β 는 치주인대세포의 활성도를 측정 한 결과, 배양 1, 2, 3일째는 대조군과의 유의한 차이가 없었고 TGF- β 의 농도가 1ng, 5ng/ml인 경우에는 배양 3일째에는 세포활성도가 통계학적으로 유의하게 증가되었으며 10ng/ml 농도의 TGF- β 를 치주인대세포에 가한 후 배양 2, 3일째는 유의하게 증가하여 1, 5, 10ng/ml농도에서 농도의존, 배양기간의존으로 증가되었다.

한편, TGF- β 는 다른 여러종류의 Polypeptide growth factor의 기능을 조절하는 것으로 알려졌는데, Ishikawa⁷⁸⁾등은 TGF- β 와 PDGF에 대한 섬유모세포 조절기전에 대한 보고에서 TGF- β 는 어떤 세포에서는 PDGF 수용기를 증가시키며, PDGF mRNA를 생산하여 해당세포의 수용기 발현을 통해 외인성 PDGF에 대한 더욱 민감한 반응을 보이도록 하고 동시에 PDGF의 수준을 증가시킨다고 보고하였다. 이와같은 TGF- β 와 PDGF를 복합투여시 TGF- β 1 단독으로 가하는 경우보다 백서의 창상 치유모델에서 유의하게 높은 수준의 교원질 침착을 자극하는 것으로 보고되었고⁷⁹⁾, Pfeilschiffer와 Mundy³⁸⁾는 이들의 복합투여시 조골세포와 같은 유사세포에 대한 화학주성 반응이 증가되었다고 보고하였다.

골개조 과정에 관여하는 국소적인자중 Transforming growth factor β (TGF- β)는 중요한 역할을 하는데^{80,81)}. TGF- β 는 골기질 내에 저장되어 있다³⁸⁾, 골 흡수시에 활성화된 형태로 방출되어진다⁷⁴⁾. in vitro에서 골세포에 대하여 TGF- β 가 잠재적이고 강력한 효과를 보이지만 파골세포와 조골세포에 대한 효과는 서로 상반된 것으로 관찰되어졌다⁸²⁻⁸⁴⁾. 부분적으로 이러한 차이점은 기관배양계(organ culture system)에서 prostaglandin 합성을 자극하는 TGF- β 의 능력의 차이일 수 있다고 여겨진다⁸³⁻⁸⁵⁾. in vivo에서 연구되어 보고된 결과에서 TGF- β 가 골막의 조골세포에 강력한 효과를 보인다고 보고한 바 있으나⁸⁵⁾, 이는 관찰기간이 12일로 너무 짧았고 파골세포에 대한 효과와 prostaglandin에 대한 반응에서 TGF- β

의 의존성은 평가되지 않았다.

vitamin D₃ 100ng/ml과 TGF- β 10ng/ml를 동시투여군에서는 배양 1일째 대조군 및 TGF- β 단독투여군(10ng/ml)에 비해 증가되었으며 TGF- β 50, 100ng/ml 농도에서는 대조군 및 TGF- β 단독투여군(10ng/ml)에 비해 증가되었으며 배양 3일째에는 100ng의 vitamin D₃만 활성증가가 유지되었다. TGF- β (5ng/ml)에 vitamin D₃ 혼합투여한 배양 1일째에 대조군과 차이가 없었지만 2, 3일째에는 vitamin D₃ 농도의존으로 증가하였으며 모두 통계학적으로 유의하였다(P<0.05). TGF- β (1ng/ml)와 vitamin D₃를 혼합투여 배양한 경우 배양 1, 2일군에서는 대조군 및 단독투여군에 비해 큰 차이가 없었으나 배양 3일군에서도 100ng/ml 농도에서 유의성있는 증가를 보였다(P<0.05). Table 4에서와 같이 TGF- β (5ng/ml)에 vitamin D₃ 혼합투여한 배양 1일째에 대조군과 차이가 없었지만 2일째에 vitamin D₃ 50ng/ml과 100ng/ml을 투여한 경우 두 군간의 뚜렷한 차이가 없고 거의 유사하였는데 이는 복합투여시 50ng/ml에서 피크를 이루는 biphasic pattern을 보인다고 사료되었고 Table 5에서 TGF- β (10ng/ml)에 vitamin D₃ 혼합투여한 배양 2일째에 저농도인 vitamin D₃ 10ng을 제외하고 50, 100ng에서 이러한 증가는 TGF- β 단독투여나 vitamin D₃ 단독투여시보다 TGF- β 와 vitamin D₃의 혼합투여시 상승작용을 보인 것으로 사료되었다.

본 실험에서 이들 vitamin D₃와 TGF- β 를 동시에 가할 경우 치주인대세포는 vitamin D₃ 혹은 TGF- β 를 단독으로 가한 경우보다 치주인대세포의 활성화는 증가되며 치주인대부위에서 교정력을 가했을 때 치유 과정에 있어 단독으로 사용시보다 더욱 유용할 것으로 여겨졌다. 이와같은 TGF- β 의 단독사용 및 복합사용시의 상반된 작용때문에 vitamin D₃와 복합사용시 혹은 TGF- β 와 vitamin D₃를 여러 농도에서 단독으로 사용하였을 경우의 증식효과를 결정하는 것이 필요하며, 이들 각각이 치은 및 치주인대 섬유모세포에 각기 미치는 영향에 관한 보다 자세한 평가가 요구되며 적절한 농도의 TGF- β 와 vitamin D₃의 복합사용은 치주인대세포를 매개로 골조직의 개조과정인 교정치료시 치아의 이동을 촉진시킬 수 있는 보조적 수단이 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

교정력에 의한 골개조 과정에서 중심적 역할을 하

는 치주인대세포의 생물학적 기능을 알아보고자, 골대사에 관계가 있는 것으로 알려진 vitamin D₃나 TGF- β 가 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. 발거된 치아로부터 채취되어 배양된 치주인대세포에 10, 50, 100ng/ml 농도의 vitamin D₃와 0.1, 1, 5, 10ng/ml 농도의 TGF- β 를 개별적으로 혹은 동시 투여하여 MTT assay를 통해 세포활성도를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 10ng/ml 농도의 vitamin D₃를 치주인대세포에 가한 후 배양 1, 2, 3일째의 활성화는 대조군과 차이가 없었으나, 50ng/ml 농도로 가한 후 배양 3일째에는 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 100ng/ml 농도에서는 배양 1, 2, 3일째에 유의하게 증가하였다.
2. 0.1ng/ml 농도의 TGF- β 를 치주인대세포에 가한 후 배양 1, 2, 3일째의 활성화는 대조군과 유의한 차이가 없었으나, 1ng/ml나 5ng/ml 농도의 TGF- β 를 가한 경우 배양 3일째에 유의하게 증가되었으며 10ng/ml 농도의 경우에는 배양 2, 3일째에 유의하게 증가하였다.
3. 1ng/ml 농도의 TGF- β 와 다양한 농도의 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 100ng/ml 농도의 vitamin D₃로 배양 3일째에 유의한 활성화 증가를 볼 수 있었다.
4. 5ng/ml 농도의 TGF- β 와 다양한 농도의 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 10, 50, 100ng/ml의 vitamin D₃에서 공히 배양 2일째부터 유의한 활성화 증가를 보였으나 10ng/ml에서는 배양 3일째에 그 활성이 유지되지 못하였다.
5. 10ng/ml 농도의 TGF- β 와 다양한 농도의 vitamin D₃를 혼합투여한 경우, 50ng/ml의 vitamin D₃에서는 배양 2일째부터 100ng/ml의 vitamin D₃에서는 1일째부터 유의한 활성화 증가를 보였다.

참 고 문 헌

1. Reitan K. Tissue rearrangement during retention of orthodontically rotated teeth. *Angle Orthod* 1959;29: 105-113.
2. Martin Tj, KW Ng and Suda T. Bone cell physiology. *Endocrinol Met Clin N Am* 1989;18:833-858.
3. Nijweide PJ, Burger EH and Feyen JHM. Cell of bones: Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. *Physiol Rev* 1986;66:855-886.
4. Canalis E, McCarthy TL and Centrella M. The role of

- growth factors in skeletal remodeling. *Endocrin Metabol Clin N Am* 1989;18:903.
5. Raisz RZ. Hormonal regulation of bone growth and remodelling. *Ciba Foundation Symposium*, 1988;136: 226-238.
 6. Eugene P. Dental biochemistry. Lea and Febiger. USA 1976;2nd:102-103.
 7. Raisz RZ. Recent advances in bone cell biology : interactions of vitamin D with other local and systemic factors. *Bone Mineral* 1990;9:191-197.
 8. Collins MK and Sinclair PM. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1988;94:278-284.
 9. Beresford JN, Gallagher JA, Russell RG. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and human bone derived cells in vitro : Effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology* 1986;199: 1776-1785.
 10. Endo H, Kitoki M, Kawashima K, Naruchi T and Hashimoto Y. Vitamin D₃ metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur in vitro. *Nature*, 1980;286:262-264.
 11. Erben RG, Weister J, Sinowatz F, Rambeek WA and Zucker H. Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1992;50:228-236.
 12. Farley JR, Taylor AK and Baylink DJ. PTH and 1,25-(OH)₂D₃ can modulate the effect of a putative skeletal coupling factor in vivo. *Calcif Tissue Int* 1982;34:538(abstract).
 13. DeLarco JE and Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75: 4001-4005.
 14. Roberts, AB, Frolik CA, Anzano MA and Sporn MB. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Fed Proc* 1983;42: 2621-2626.
 15. Anazano AM, Roberts AB, Meyers CA, Komoriya A, Lamb LC, Smith JM and Sporn MB. Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. *Cancer Res*. 1982;42: 4776-4782.
 16. Roberts AB, Anzano MB, Wakefield LM, Roche NS, Stern AF and Sporn MB. Type beta transforming growth factor : a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:119-123.
 17. Keski-Oja J, Leof EB, Lyons RM, Coffey RJ Jr and Moses HL. Transforming growth factors and control of neoplastic cell growth. *J Cell Biochem* 1987;33:95-107.
 18. Spron MB, Roberts AB, Wakefield LN and Decro-nbrugge B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta. *J Cell Biol* 1987;105L:1039-1045.
 19. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL and Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1987;165:251-265.
 20. Ihnorz R and Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986;261L:4337-4345.
 21. Roberts AN, Sporn MB and Assoian RK. Transforming growth factor type-beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4167.
 22. Wrana JL, Sodek J, Ber RL and Vellows CG. The effects of platelet derived transforming growth factor β on normal human diploid gingival fibroblasts. *Eur J Biochem* 1986; 159:69-76.
 23. Centrella M, Massague J and Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor-beta stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1986;119:2306-2312.
 24. Centrella M, McCarthy TL and Canalis E. Transforming Growth factor beta(TGF- β) is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 1987;262:2869-2874.
 25. Ibotson KJ, Orcutt CM, Anglin AM and D'Souza SM. Effects of transforming growth factor β 1 and β 2 on a mouse clonal, osteoblast-like cell line MC3T3-E1. *J Bone Miner Res* 1989;4:37-45.
 26. Robey PG, Young MF and Flangders KC. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor beta(TGF- β) in vitro. *J Cell Biol* 1987; 105:457-463.
 27. Noda M and Rodan GA. Type- β transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;140:56-65.
 28. Takehara K, LeRoy EC and Grotendorst GR. TGF- β inhibition of endothelial cell proliferation, alteration of EGF binding and EGF-induced growth-regulatory (competence) gene expression. *Cell* 1987;49:415-422.
 29. Leoff EB, proper JA, Gousin AS, Shipley GD, DiCorleto AE and Moses HL. Induction of mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor B :

- a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:2453-2457.
30. Robey PG, MF Young, KC Flanders, NS Roche, P Kondaiah, AH Reddi, JD Termini, MB Sporn and AB Roberts. Osteoclasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. J Cell Biol 1987;105:457-463.
 31. Carrington JL, AB Roberts, KC Flanders, NS Roche and AH Red. Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor β during endochondral bone development. J Cell Biol 1988;107:1969-1975.
 32. Sandberg M, H Autio-Harminen and E Vuorio. Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF- β 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones. Dev Biol 1988;130:324-334.
 33. Pfeilschifter J and GR Mundy. Modulation of type β transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:2024-2028.
 34. Oreffo ROC, GR Mundy, SM Seyedin and LF Bonewald. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. Biochem Biophys Res. Commun 1989; 158:817-823.
 35. Pfeilshifter J, SM Seyedin and GR Mundy. Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. J Clin Invest 1988;82: 680-685.
 36. Rygh P. Periodontal response to tooth-moving force, in orthodontics : State of the art essence of science. edited by Garber LW, Mosby, St. Louis, Toronto, London, 1986;110-115.
 37. Roberts WE, Goodwin WC and Heiner SR. Cellular response to orthodontic force. Dent Clin of North Am 1981;25:3-17.
 38. Pfeilshifter J and Mundy GR. Modulation of type β transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1985;84:2024-2028.
 39. Davidovitch A, Fjinkelson MD, Steigman S, Shanfield J, Montgomery P and Korostoff E. Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. Am J Orthod 1980; 77:33-47.
 40. Yamasaki K, Shibata Y, Imia S, Tani Y, Shibasaki Y and Fukuhara T. Clinical application of prostaglandin E1 upon orthodontic tooth movement. AM J Orthod 1984;85:508-518.
 41. Stark T and Sinclair P. The effect of pulsed electromagnetic fields on orthodontic tooth movement. Am J Orthod 1987;91:91-104.
 42. Gould TRL, Melcher AH and Brunette DM. Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. J Periodont Res 1980;15:20-42.
 43. Aukhil I, Simpson DM, Suggs C. and Petterson E. In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament.: An experimental study using physical barriers. J Clin. Periodontol 1986;13:862-868.
 44. McCulloch CAG, Nementh E, Lowenberg B and Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. Ant Rec 1987;219:233-242.
 45. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T and Hasegawa K. Fibro- blastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. J Periodont Res 1990; 25:179-185.
 46. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR and Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. J Dent Res 1988;67:66-70.
 47. Bikle DD, Morrissey RL, Zolock DT and Rasmussen H. The intestinal response to vitamin D Rev Physiol Biochem Pharmacol 1981;89:63.
 48. Chen TL, Cone Cm and Feldman D. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and glucocorticoids on the growth of rat and mouse osteoblast-like cells. Calcif Tissue Int 1983;35:806-811.
 49. Nakamura T, Nagai Y, Yamato H, Suzuki K and Orimo H. Regulation of bone turnover of prevention of bone atrophy in ovariectomized beagle dogs by the administration of 24,25 (OH)2D3. Calcif Tissue Int 1992;50:221-227.
 50. Norman AW. Actinomycin D and the response to vitamin D. Science 1965;149-184.
 51. Norman AW. Vitamin D: the calcium homeostatic hormone. New York; Academic Press 1979;199-245.
 52. Reynolds JJ, Hollick MF and Deluca HF. The role of vitamin D metabolites in bone resorption. Calcif Tissue Res 1973;12:295-301.
 53. White J, Lielain M and Helenus A. Membrane fusion proteins of enveloped animal virus. Rev Biophys 1983;151-195.
 54. Canalis E, McCarthy TL and Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. Endocrin Metabol Clin N Am 1989;18:903-909.
 55. Bonewald LF and Mundy GR. Role of transforming

- growth factor- β in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* 1990;250:261-265.
56. Wakefield LM, Smith DM, Masui T, Harris CC and Spron MB. Distribution and modulation of the cellular receptor for transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 1987;105:965-969.
 57. Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C and Heldin CH. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1: Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 1988;263: 5407-5412.
 58. Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC and Sporn MB. Latent transforming growth factor- β from human platelets. *J Biol Chem* 1988;263: 7646-7652.
 59. Roberts AB and Spron MB. The transforming growth factor- β . In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Germany, 1990;95:419.
 60. O'Conner-McCourt MD and Wakefield LM. Latent transforming growth factor beta in serum. *J Biol Chem* 1987;262:14090-14097.
 61. Jennings JC and Mohan S. Heterogeneity of latent transforming growth factor- β isolated from bone-matrix proteins. *Endocrinology* 1990;126:1014-1021.
 62. Centrella M, McCarthy TL and Canalis E. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoclast-enriched cell culture from fetal rat bone. *J. Biol Chem* 1987;262:2869.
 63. Noda M, Yoon K, Prince CW, Butler WT and Rodan GA. Transcriptional regulation of osteonectin production in rat osteosarcoma I type β Transforming growth factor. *J Biol Chem* 1988;263:3916.
 64. Wrana JL, Maeno M, Hawrylyshyn B, Yao KL, Domicucci C and Sodek. J Differential effects of Transforming growth factor β on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J. Cell Biol* 1988; 106:915.
 65. Noda M and Rodan GA. Type beta Transforming growth factor β regulation of alkaline phosphatase expression and other phenotype related mRNAs in osteoblastic osteosarcoma cells. *J Cell Physiol* 1987; 133:426.
 66. Pfeilshifter J, D'Sausa SM and Mundy GR. Effect of transforming growth factor β osteoblastic osteosarcoma cell. *Endocrinology* 1987;121:212.
 67. Centrella M, Massague J and Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor β stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1986;119:2306.
 68. Roby PG, Young M, Flander KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD Sporn MB and Roberts AB. Osteoblasts synthesize and response to transforming growth factor type β in vitro. *J Cell Biol* 1987;105:457.
 69. Noda M and Rodan GA. Type β transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;140:56.
 70. Noda M. Transcriptional regulation of osteocalcin production by the type β transforming growth factor in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1989;124: 612.
 71. Tashjian AH, Voekel EF Lazzaro M, Singer FR, Roberts AB, Derynck R, Winkler ME and Levine L. α and β human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;82:4535.
 72. Pfeilshifter J, Seyedin SM and Mundy GR. Transforming growth factor β inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J Clin Invest* 1988; 82:680.
 73. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS Stern DF and Sporn MB. Type β transforming growth factor, a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:119.
 74. Centrella M, McCarthy TL and Canalis E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 1987;262:2869-2874.
 75. Centrella M, Massague J and Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor-beta stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1986;119:2306-2312.
 76. Piche JE, Carnes DL and Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 1989;68:761-767.
 77. Thomas W. Oates, Cheryl A Rouse, and David L Cochran. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993;64:142-148.
 78. Ishikawa O, Leroy EC and Trojanowska M. Mitogenic effect of transforming growth factor beta 1 on human fibroblasts involves the induction of platelet derived growth factor-alpha receptor. *J Cell Physiol* 1990;145: 181-186.
 79. Roberts AB, Wakefield LM and Decrombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology

- of transforming growth factor-beta. J Cell Biol 1987;105: 1039-1045.
80. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Skeletal tissue and transforming growth factor β . Faser J 1988;2: 3066-3073.
81. Seyedin S, Thomson AY, Bentz H, Rosen DM, McPherson JM, Conti A, Siegel NR, Gallupi GR and Piez KA. Cartilage-inducing factor-A; apparent identity to transforming growth factor- β . J Biol Chem 1986;261:5693-5695.
82. Tashjian AJ jr, Voelkel EF, Lazzaro M, Singer FR, Roberts AB, Derynck R, Winkler ME and Levine L. α and β human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:4535-4538.
83. Chenu C, Pfeilschifter J, Mundy GR and Roodman GD. Transforming growth factor β inhibits formation of osteoclast-like cells in long term human marrow cultures. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:5683-5687.
84. Centrella M, Massagué J and Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor β stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. Endocrinology 1986;119:2306-2312.
85. Noda M and Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor β . Endocrinology 1989;124:2991-2994.

-ABSTRACT-

THE EFFECT OF VITAMIN D₃ AND TGF- β ON THE VIABILITY OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Hyun-Sup Song, Sang-Cheol Kim

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Wonkwang University

TGF- β is a polypeptide with multiple physiological functions in regulation of cell-to-cell interaction and in growth and development. The active form of vitamin D₃, 1,25-dihydroxycholecalciferol [1,25-(OH)₂D₃], is one of the most potent stimulators of osteoclastic activity.

The purpose of this study was to evaluate the effect of Vitamin D₃ and/or TGF- β on the periodontal ligament(PDL) cells. Human PDL cells were prepared from the first premolars extracted for the orthodontic treatment and were incubated in the environment of 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. 10, 50 or 100ng/ml of 1,25-(OH)₂D₃ and 0.1, 1, 5 or 10ng/ml of TGF- β were administered to the culture wells, separately or in combination. And the viability of PDL cells was evaluated by MTT assay.

The obtained results were as follows.

1. The viability of PDL cells in 10ng/ml of vitamin D₃ was not significantly different from that of the control group at 1, 2 and 3-day of cultivation, but it was significantly increased in 50ng/ml of Vitamin D₃ at 3-day and in 100ng/ml of Vitamin D₃ at 2 and 3-day.
2. The viability of PDL cells in 0.1ng/ml of TGF- β was not significantly different from that of the control group at 1, 2 and 3-day of cultivation, but it was significantly increased in 1 and 5ng/ml of TGF- β at 3-day of cultivation, and in 10ng/ml of TGF- β at 2 and 3-day of cultivation.

3. In case of admixture of 1ng/ml of TGF- β and the various concentrations of vitamin D₃, the viability of PDL cells was significantly increased in the admixture of 100ng/ml of vitamin D₃ at 3-day of cultivation
4. In case of admixture of 5ng/ml of TGF- β and the various concentrations of vitamin D₃, the viability of PDL cells began to be increased from 2-day of cultivation in the admixture of 10 50 and 100ng/ml of vitamin D₃, but it was not maintained at 3-day in the admixture of 10ng/m of vitamin D₃.
5. In case of admixture of 10ng/ml of TGF- β and the various concentrations of vitamin D₃, the viability of PDL cells was significantly increased in the admixture of 50ng/ml of vitamin D₃ at 2 and 3-day of cultivation, and in the admixture of 100ng/ml at 1, 2 and 3-day.

KOREA. J. ORTHOD. 1998 ; 28 : 627-640

※ Key words : periodontal cell, vitamin D₃, TGF- β