대한치주과학회지 : Vol. 29, No. 4, 1999

전기 자극이 치주인대세포와 치은섬유아세포에 미치는 영향

이 욱 · 박준봉 · 이만섭 · 권영혁

경희대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주치료의 궁극적 목표는 치주질환으로 인해 소실된 치주조직을 정상적인 구조와 기능을 가지도록 재생시키는 것인데, 이러한 치주조직은 치은, 치조골, 치주인대 및 백악질 등의 각기 다른 세포들의 집합체로 구성되어있다. 따라서, 치주조직을 구성하고 있는 요소들의 다양성은 소실된 치주조직을 효과적으로 재생시키기 위한 환경의 부여에 많은 어려움을 야기한다.

치주조직의 재생의 요건은 결합조직의 신부착과 치조골의 재생으로 대별할 수 있다[1]. 많은 임상적인 시술의 발전을 통해 부착기구의 재생과 골형성을 위한 기반을 마련하였지만, 특히 골형성은 항상 일관적으로 일어나는 것은 아니었기에[2, 3], 치주재생술의 연구에 있어서 골형성을 자극할 수 있는 요소의 모색이 중요 관심 분야 이어왔다. 이러한 요소로는 골형성과 대사에 관여하는 cytokine과 growth factors[4, 5]와 또 다른 요소로서 자연 발생적으로 형성되는 생체 전기를 들 수 있다.

Volta전지가 고안된 이후로 전기를 의약적인 목적으로 이용하려는 많은 시도들이 있었다. 그 중에서도 골에 관련된 전기 자극의 이용에 대해서 최초의 임상적 시도는 19세기에 비유합성 경골 골절에 이용되어 성공적인 치료 결과가 보고된 바 있다[6]. 그러나, 이 시기의 전기 자극의 임상적 이용은 과학적인 기초 하에서의 접근이라기보다는 다소 주술적인 측면이 더 강하였다. 1953년 Yasuda[7]가 전기 자극을 이용하여 실험적으로 골이 형성됨을 보고하고, 이후에 장골에서 외력을 받을 때 piezoelectrical current[8-9]가 발생됨이 발견되면서부터 정형외과 영역에서 치료의 한 방법으로의 전기 자극의 이용에 대한 관심이 더욱 고조되었다.

Piezoelectrical current는 개의 하악골[10]과 인간의 하악골[11]에서 각각 발견되었는데, 이러한 연구보고들은 골에 기계적 부하가 가해지면 전위가 형성되어 골 대사와 골형성을 변화, 촉진시킨다는 가설을 밑받침하게 되었다. 이후에 실험동물에서 전극[9], 혹은 전하를 띤 Teflon film[12]을 이용하여 전기 자극을 가했을 때 골형성이 유도됨이 보고된 바 있다. 또한 Bassett 등[13]은 비글견의 대퇴골 골절 실험에서 전기 자극을 가하였을 때 음극(cathode)에서 골형성이 촉진됨을 보고하였고, 이는 골아세포의 증식이 촉진되었기 때문이라고 해석하였다. 한편, 전기 자극을 이용하여 인간을 대상으로 한 임상적 연구들에서는 기존의 방법으로 치료되지 않던 비유합성 골절부의 치료나 가관절증

(pseudoarthroses)의 치료를 위해 적용하여, 치유 촉진 및 골 조직화의 촉진이 관찰, 보고된 바 있다[14-18]. 이러한 연구들은 대부분이 초기 실험적 연구이거나 임상 증례 보고였지만, 전기 자극의 긍정적 효과를 입증시켜 이의 임상 적용 잠재성을 뒷받침하게 되었다.

한편, 치과적 영역에서도 전기 자극에 대한 연구들이 있었다. 치조골도 전기 자극에 의해 장골에서와 동일한 양상으로 반응한다고 보고되었고[10-11], 전기 자극이 치아 이동을 촉진시킬 수 있으며[19-20], 구개열 수술 후 치유를 촉진시킨다는 보고도 있었다[19]. 또한, 치주치료의 부가적인 방법으로 전기 자극을 이용하기 위한 초기 연구들도 진행되었는데, Jacobs 등[21]의 연구에서는 비글견의 병적 골 결손부에 nanoampere 단위의 전류를 가하였다. 그 결과, 결손부 깊이가 임상적 및 방사선학적으로 통계학적으로 유의성 있게 감소하지는 않았지만, 골수강 내로의 골 침착이 증가되었다고 보고되었다. 다른 연구에서는 10㎂의 전기 자극을 통해 개의 하악골에서 내부 골개조 증가[22] 및 실험적으로 형성된 수평 골 결손부에서의 치조골 재생[23]이 보고된 바 있다. 그리고, 전기 자극을 통해 신생 백악질의 형성이 촉진되었다는 보고도 있었다[24]. 그러나, Steffensen 등[24]은 23명의 환자를 대상으로 치주수술 후 전기 자극을 가한 경우, 실험군에서 결손부 치조골 높이가 통계학적으로 유의성 있게 증가하였지만 그 편차가 컸고, 임상부착수준의 변화의 차이는 없었다고 보고한 바 있다.

현재까지, 치주질환에 의해 파괴된 치주조직의 재생을 위해 전기 자극을 이용하는 것에 대해서는 그 연구가 아직 초기단계에 있으며, 전기 자극이 세포에 영향 미치는 작용기전 역시 연구가 진행 중이다. 최근에, 박 등[25]의 연구에서는 백서의 배양 두개관 골세포를 대상으로 한 실험을 통해 전기 자극이 세포의 알칼리성 인산분해효소의 활성도를 증가시킨다고 보고한 바 있고, 그 결과는 Matsunaga 등[27, 28]과 McLeod 등[29]의 전기 자극을 이용한 연구 결과와 일치하는 것이었다. 이러한 결과는 전기 자극이 골세포의 증식뿐 아니라 분화상태에도 영향을 준다는 것을 의미한다.

전기 자극에 대한 이상의 연구들을 토대로, 본 연구에서는 치주조직을 이루는 여러 세포들 중, 치주조직의 재생에 있어서 중요성을 지니는 치주인대세포와 치은섬유아세포를 대상으로 세포증식, 단백질 함량, 알칼리성 인산분해효소 활성도를 측정하여, 전기 자극이 이들 세포에 미치는 영향에 대해 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

(1) 전기 자극기 및 전기 자극용 세포배양접시

본 실험에 이용된 전기 자극기는 Acutron multiwave 911기기(Microcurrent Research, INC., U.S.A.)가 이용되었다. 본 기기는 0.1㎂에서 60㎃까지의 전류 강도 및 0.1 - 990Hz의 주파수 크기를 조절할 수 있으며, 4개의 독립된 출력채널을 가지고 있다. 그리고, 이러한 전기 자극을 세포에 직접 전달하기 위해 배양접시를 고안하였는데, 6 - well 세포배양접시(Corning, U.S.A.)의 뚜껑부위에 각 well당 각각 두 개의 직경 0.7mm의 stainless steel wire electrode를 부착시켜 배양접시의 뚜껑을 닫았을 때 전극이 배양액 내로 충분히 잠길 수 있도록 하였고, 외부에 노출된 전극에 전선을 연결하여 전기 자극기에 연결시킬 수 있는 소켓을 부착시켰다.

(2) 세포배양

연구대상으로는 전신 건강이 양호한 성인의 임상적으로 염증이 없는 건강한 치주조직에서 초기 배양한 치주인대세포와 치은섬유아세포를 이용하였다. 치주인대세포와 치은섬유아세

포의 배양은 Somerman 등[30]의 방법에 의하여 시행하였다.

① 치주인대세포의 배양

교정치료를 목적으로 내원한 환자로부터 제1소구치를 발거한 다음, 이를 200 unit/ml penicillin (Gibco, U.S.A.), 200 μg/ml streptomycin(Gibco, U.S.A.), 그리고 1 μg/ml amphotericin - B(Gibco, U.S.A.)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Gibco, U.S.A., 이하 DMEM으로 표기)으로 구성된 생검배지에 4회 세척하였다. 치근의 치관측 ⅓부위와 치근단측 ⅓부위를 제외한 중앙 ⅓부위에서 치주인대 조직을 blade로 채취하여 직경 35mm의 배양 접시에 고르게 분포시킨 다음, 20% Fetal bovine serum(Gibco, U.S.A., 이하 FBS로 표기)과 100 unit/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 0.5 μg/ml amphotericin - B가 포함된 DMEM으로 구성된 배양액을 넣고, 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 공기혼합 배양기(Vision Scientific Co., Korea)에서 초기 배양하였다.

치주인대세포가 조직절편으로부터 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층이 형성되면 0.05% Trypsin/0.02% EDTA를 처리하여 배양접시로부터 세포를 박리하고 1:3 계대배양하여 4 - 7세대의 세포를 실험에 이용하였다.

② 치은섬유아세포의 배양

교정치료를 목적으로 발거할 제1소구치의 치간 유두 부위의 치은조직을 채취하여 치주인대 조직을 세척한 것과 동일한 생검배지에 4회 세척하였다. 조직편을 약 1mm^{3}의 크기로 세절하여 직경 35mm의 배양접시에 10 - 15조각 정도를 고르게 분포시킨 다음, 치주인대세포 배양에서와 같은 방법으로 배양하여 4 - 7세대의 세포를 실험에 이용하였다.

2. 연구방법

(1) 대조군 및 실험군 설정

10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 0.5μg/ml amphotericin - B가 포함된 DMEM으로 구성된 배양액을 표준배양액으로 하여, 전기 자극을 가하지 않고 세포를 배양한 군을 대조군(C)으로 설정하였으며, 이 표준배양액으로 배양하면서 전기 자극을 가한 군을 실험군으로 하였다. 또한, 실험군을 전기 자극의 세기(전류의 세기)에 따라 3분하여, 0.25μA의 전류(30Hz)를 12 시간동안 가한 군을 제1군(T1)으로, 1.0μA의 전류(30Hz)를 12 시간 동안 가한 군을 제2군(T2)으로 설정하였다. 그리고, 2.5μA의 전류(30Hz)를 12 시간동안 가한 군을 제3군(T3)으로 설정하였다.

(2) 세포 수 측정

치주인대세포와 치은섬유아세포를 각각 5×10^4 cells/ml의 세포 수가 되도록 하여 대조군은 보통의 6 - well 세포배양접시의 4개의 well에 분주하였고, 각각의 실험군은 2조의 전기 자극용 6 - well 세포배양접시의 4개 well에 분주하여 총 16개의 well에 세포를 분주한 다음, 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 0.5 μg/ml amphotericin - B가 포함된 DMEM으로 구성된 표준배양액으로 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 공기혼합 배양기에서 배양하였다. 세포 분주 24 시간 뒤에 세포의 부착여부를 확인한 다음 모든 well의 배지를 표준배양액으로 배양액 교체 후, 각 실험군에 12 시간동안 전기 자극을 가하였다. 전기 자극 종료 후 다시 모든 well의 배양액을 교체하고, 세포를 분주한 시점에서 4 일째에(전기 자극 종료 후 60 시간 추가 배양함) 인산완충 생리식염수(Phosphate buffered saline)로 3회 세척하고, 0.05% Trypsin / 0.02% EDTA(Gibco, U.S.A.)로 처리하여 각 well에서 세포를 모두 박리한 다음, hemocytometer를 이용하여 도립현미경(Olympus Co., Japan)하에서 세포 수

를 측정하였다.

(3) 단백질 함량 측정

치주인대세포와 치은섬유아세포를 각각 5×10^4 cells/ml의 세포 수가 되도록 하여 세포 수 측정에서와 동일한 방법으로 세포 분주, 배양, 전기 자극을 시행하였다. 분주한 시점에서 4일 동안 배양 후에 인산완충 생리식염수(Phosphate buffered saline)로 3회 세척하고, 0.05% Trypsin / 0.02% EDTA(Gibco, U.S.A.)로 처리하여 세포를 박리한 다음, 1,500 rpm으로 6분간 원심 분리하여 얻은 cell pellet을 0.5㎖ deionized distilled water에 넣고 vortex mixer(Vision Scientific Co., Korea)를 이용하여 혼합하였다. 초음파 세포 분쇄기(Ultrasonic Dismembrator model - 300, Fisher Scientific, U.S.A.)로 세포막을 분쇄하고, 이중 100㎕를 취하여 protein assay kit 시약(BIO - RAD, U.S.A.)을 5㎖ 넣고 혼합 후 실온에서 5분간 방치하였다. 이를 UV - VIS spectrophotometer(Shimatsu Co., Japan)로 595㎚에서 흡광도를 측정하였다. Bovine serum albumin을 1.39㎎/㎖로 만들어 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선을 기준으로 단백질 함량을 측정하였다.

(4) 염기성 인산분해효소 활성도 측정

치주인대세포와 치은섬유아세포를 각각 5×10^4 cells/ml의 세포 수가 되도록 하여 세포 수 측정에서와 동일한 방법으로 세포 분주, 배양, 전기 자극을 시행하였다. 분주한 시점에서 4일 동안 배양 후에 인산완충 생리식염수(Phosphate buffered saline)로 3회 세척하고, 0.05% Trypsin / 0.02% EDTA(Gibco, U.S.A.)로 처리하여 세포를 박리한 다음, 1,500 rpm으로 6분간 원심 분리하여 얻은 cell pellet을 0.5㎖ deionized distilled water에 넣고 vortex mixer(Vision Scientific Co., Korea)를 이용하여 혼합하였다. 초음파 세포 분쇄기(Ultrasonic Dismembrator model - 300, Fisher Scientific, U.S.A.)로 세포막을 분쇄하고 이중 50㎕를 취하여 염기성 인산분해효소 활성도 측정용 시약(Al.P.Kit, 영동제약, Korea)의 기질액 2㎖에 넣어주고 15분간 37℃ water bath(Vision Scientific Co., Korea)에 방치하였다. 여기에 시약의 발색액 2㎖를 넣어주고 vortex mixer(Vision Scientific Co., Korea)를 이용하여 혼합한 후, UV - VIS spectrophotometer(Shimatsu Co., Japan)로 500㎚에서 흡광도를 측정하고 정규곡선을 이용하여 염기성 인산분해효소의 활성도를 측정하였다.

(5) 통계분석

세포 수, 단백질 함량, 그리고 염기성 인산분해효소 활성도에 있어서 전기 자극의 효과에 대한 유의성 및 각 실험군간의 차이를 평가하기 위해 실험군 및 대조군에 대해서 각 2회씩 실험하였고(n=8), student t-test를 이용하여 $P<0.05$ 수준으로 유의성을 검증하였다.

III. 연구성적

1. 예비실험 결과

본 실험에 이용된 전기자극기인 Acutron multiwave 911기기(Microcurrent Research, INC., U.S.A.)에서의 대상 세포의 최적 전류 값과 최적 자극기간을 결정하기 위해 치주인대세포와 치은섬유아세포를 대상으로 여러 번의 예비실험을 실시하였다. 이 예비실험은 박 등[26]의 연구에서 시행한 방법과 동일하게 진행되었는데, 그 연구에서 백서의 두개관 골세포를 대상으로 시행하였던 10㎂, 12시간의 자극은 본 연구의 실험대상인 인간의 치주인대세포와 치은섬유아세포의 부분괴사를 야기하여, 일부 세포를 세포배양접시에서 탈락시켰다. 그래서, 전류 값을 각각 5, 10㎂로 낮추고, 자극기간도 6

Table 1. Effect of electrical stimulation on the proliferation of human periodontal ligament cells($\times 10^4$ cells/ml)

Group	C	T1	T2	T3
No. of Cell	11.95±1.49	15.05±1.25*	15.05±1.13*	16.92±0.93*#

Values are mean±S.D., n=8
C; control, T1; 0.25μA, T2; 1.0μA, T3; 2.5μA
*; Statistically significantly different from the control by student *t* - test(p<0.05)

Table 2. Effect of electrical stimulation on the proliferation of human gingival fibroblasts($\times 10^4$ cells/ml)

Group	C	T1	T2	T3
No. of Cell	13.41±1.37	15.54±1.60*	15.44±1.70*	15.82±1.36*

Values are mean±S.D., n=8
C; control, T1; 0.25μA, T2; 1.0μA, T3; 2.5μA
*; Statistically significantly different from the control by student *t* - test(p<0.05)

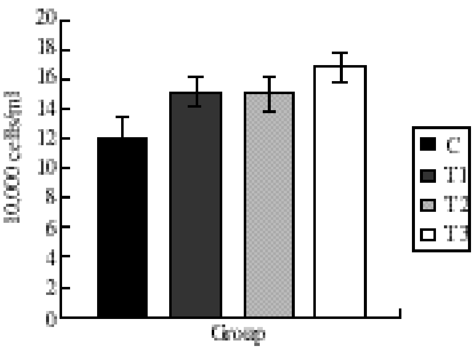

Figure 1. Effect of electrical stimulation on the proliferation of human periodontal

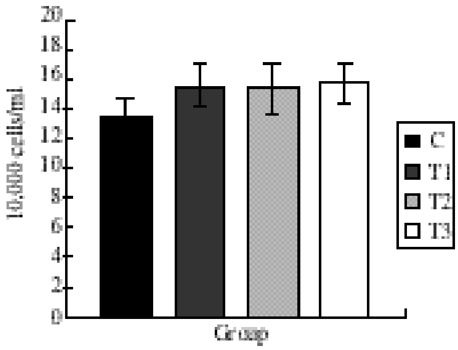

Figure 2. Effect of electrical stimulation on the proliferation of human gingival

시간으로 단축하여 다시 실험하였다. 그 결과 역시, 일부세포의 부착상태의 소실을 야기하였다. 전류 값을 2.5μA로 다시 낮추고, 자극 기간을 3, 6, 9, 12시간으로 나누어 매 3시간마다 세포의 상태를 위상차 현미경 하에서 관찰하였는데, 이러한 방법에서는 12시간까지 자극을 가한 경우에도 세포탈락이 거의 관찰되지 않았기 때문에, 본 연구에서는 최고 전류 값을 2.5μA로 설정하고, 이외에 0.25μA, 1.0μA의 전류값을 추가 설정하고 자극기간은 12시간으로 통일화시켜 전류의 세기에 따른 각 실험군간의 차이도 관찰 하고자 하였다.

2. 세포 수 측정

치주인대세포와 치은섬유아세포 각각에 전기자극을 가한 실험군과 표준 배양액으로만 배양한 대조군의 세포증식도를 측정, 비교하였다.

Table 3. Effect of electrical stimulation on the protein level of human periodontal ligament cells(μg/ml)

Group	C	T1	T2	T3
Protein level	27.17±0.52	25.78±0.38	26.18±1.13	26.51±0.71

Values are mean±S.D., n=8
C; control, T1; 0.25μA, T2; 1.0μA, T3; 2.5μA
*; Statistically significantly different from the control by student *t*-test($p<0.05$)

Table 4. Effect of electrical stimulation on the protein level of human gingival fibroblasts(μg/ml)

Group	C	T1	T2	T3
Protein level	26.99±0.80	27.49±1.07	27.37±1.23	28.27±1.25

Values are mean±S.D., n=8
C; control, T1; 0.25μA, T2; 1.0μA, T3; 2.5μA
*; Statistically significantly different from the control by student *t*-test($p<0.05$)
#; Statistically significantly different from the other test group by student *t*-test($p<0.05$)

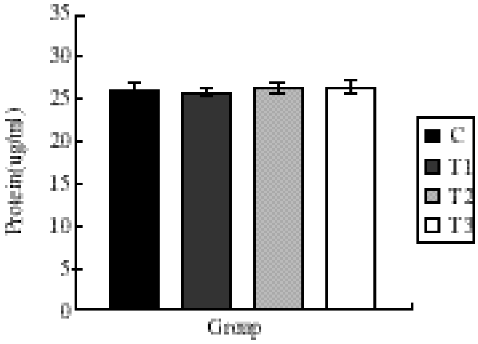

Figure 3. Effect of electriacal stimulation on the protein level of human periodontal

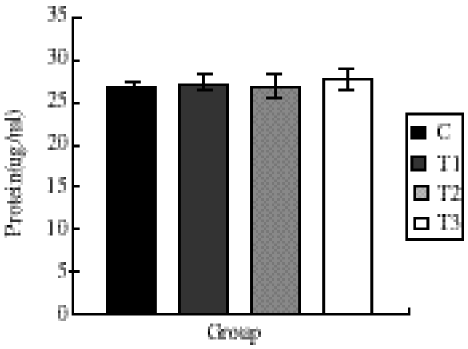

Figure 4. Effect of electriacal stimulation on the protein level of human gingival

대조군과 모든 실험군에서 초기 분주한 세포 수보다 더 많이 증식이 일어났으나, 치주인대세포와 치은섬유아세포 모두에서 대조군보다는 모든 실험군에서 더 많은 세포 수를 나타내었다.

치주인대세포의 경우, 대조군은 11.95±1.49 cells/mℓ인 반면에, 0.25μA의 전류를 가한 실험군 제1군은 15.05±1.25 cells/mℓ이었고, 1.0μA의 전류를 가한 제2군은 15.05±1.13, 그리고, 2.5μA의 전류를 가한 제3군에서는 16.92±0.93 cells/mℓ의 세포 수를 나타내었고, 모든 실험군이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 세포 수가 증가하였다($p<0.05$). 또한, 각 실험군간의 비교 시에 제3군에서 다른 실험1, 2군에 비해 세포증식이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$)(Table 1, Figure 1).

치은섬유아세포에 있어서도 대조군은 13.41±1.37 cells/mℓ인데 비해 실험 제1군은 15.54±1.60, 제2군은 15.44±1.70, 그리고, 제3군은 15.82±1.36 cells/mℓ로 대조군에 비해 모든 실험군의 세포 수가 통계학적으로 유의성

Table 5. Effect of electrical stimulation on the alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells(IU)

Group	C	T1	T2	T3
ALP activity	36.54±2.33	44.90±4.06*	43.54±2.91*	47.00±4.45*

Values are mean±S.D., n=8
C; control, T1; 0.25μA, T2; 1.0μA, T3; 2.5μA
*; Statistically significantly different from the control by student t - test($p<0.05$)

Table 6. Effect of electrical stimulation on the alkaline phosphatase activity of human gingival fibroblastsIU)

Group	C	T1	T2	T3
ALP activity	29.80±2.96	32.06±5.32	32.92±4.50	40.88±3.12*

Values are mean±S.D., n=8
C; control, T1; 0.25μA, T2; 1.0μA, T3; 2.5μA
*; Statistically significantly different from the control by student t - test($p<0.05$)

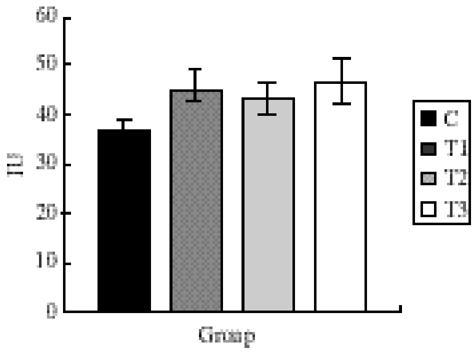

Figure 5. Effect of electrical stimulation on the alkaline phosphatase actilvity of human periodontal ligament cells

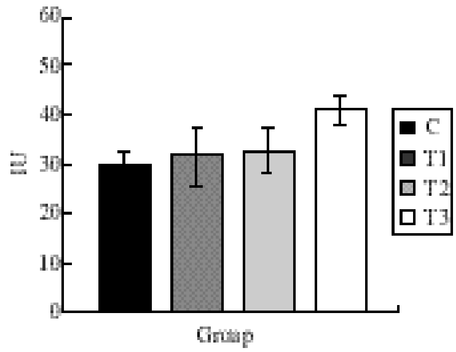

Figure 6. Effect of electrical stimulation on the alkaline phosphatase actilvity of human gingival fibroblasts

있게 더 많았다($p<0.05$). 그러나, 각 실험군간의 세포 수의 유의성 있는 차이는 발견할 수 없었다(Table 2, Figure 2).

3. 단백질 함량 측정

치주인대세포와 치은섬유아세포 각각에 전기자극을 가한 실험군과 표준 배양액으로만 배양한 대조군의 단백질 함량을 측정, 비교하였다. 치주인대세포에서는 대조군은 27.17±0.52μg/mℓ이었고, 실험 1군은 25.78±0.38, 실험 2군은 26.18±1.13, 실험 3군은 26.51±0.71μg/mℓ로 오히려 대조군에 비해서 모든 실험군의 단백질 함량이 약간 감소하는 경향을 나타냈으나, 통계학적으로 대조군과 실험군간의 유의성 있는 차이는 없었다($p>0.05$)(Table 3, Figure 3).

치은섬유아세포의 경우도 대조군은 26.99±0.80μg/mℓ이었고, 실험 1, 2, 3군은 각각 27.49±1.07, 27.37±1.23, 28.27±1.25μg/mℓ로 대조군에 비해 약간 증가하였으나 통계학적인 유

의성은 없었다($p>0.05$)(Table 4, Figure 4).

한편, 치주인대세포나 치은섬유아세포 모두 실험군에서 전기 자극의 세기가 증가할수록, 즉 제1군에서 제3군으로 갈수록 단백질 함량이 미약하게 증가하는 경향이 관찰되나, 이 역시 통계학적으로 유의성이 없었다($p>0.05$).

4. 염기성 인산분해효소 활성도 측정

치주인대세포와 치은섬유아세포 각각에 전기 자극을 가한 실험군과 표준 배양액으로만 배양한 대조군의 염기성 인산분해효소 활성도를 측정, 비교하였다.

치주인대세포에서는 대조군은 36.54±2.33 IU이고, 실험 제 1, 2, 3군은 각각 44.90±4.06, 43.54±2.91, 47.00±4.45 IU 이었다. 제1, 2, 3군 모두 대조군에 비해 염기성 인산분해효소 활성도가 통계학적으로 유의성 있게 증가된 것으로 나타났다($p<0.05$). 그러나 각 실험군간의 유의성 있는 차이는 없었다($p>0.05$)(Table 5, Figure 5).

치은섬유아세포의 경우는 대조군이 29.80±2.96 IU이었고, 실험 제1, 2, 3군은 각각 32.06±5.32, 32.92±4.50, 40.88±3.12 IU이었다. 염기성 인산분해효소의 활성도는 실험 제3군에서만 대조군이나 실험 1, 2군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 높게 나왔다($p<0.05$)(Table 6, Figure 6).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

인간의 생명력 유지에 전기가 가장 기본적인 요소라는 " animal electricity"의 개념이 18세기 Galvani에 의해 제창된 이후 많은 이론의 발전을 이루었으며, 많은 분야에서 생체에서의 전기적 활동을 임상에 응용할 수 있는 방법을 모색해 왔다. 그 중에서도 19세기에 경골의 비유합성 골절의 치료에 전기 자극을 이용하여 성공적으로 치료했다는 기록이 있었으나[6], 그 당시의 전기는 과학적인 측면보다는 주술적인 측면으로 사람들의 관심을 끌게되었다. 그러나, 1950년대에 장골에서 발생되는 piezoelectrical current에 대한 개념이 발표되고, 골에 기계적 부하가 가해졌을 때 전위가 형성되어 골대사와 골형성을 변화, 촉진시킬 수 있다는 가설이 제시되면서 주로 골형성과 관련되어 집중적으로 연구되기 시작했다[7-18].

이후에 많은 학자들에 의해 전기 자극의 잠재적인 유용성을 증명해 주는 다양한 실험적인 연구결과들이 보고되었다. 전기 자극을 통한 수족의 부분적인 재생에 대해서 보고되기도 하였으며[31, 32], 인공적으로 형성된 골 결손부에서의 골형성[15, 21, 23, 33] 및 골절 치유[14-18]의 분야 등으로 세분화되어 연구되었다. 현재에는 임상적인 연구로써 비유합성 골절이나, 가관절증(pseudoarthroses)의 치료에 실험적으로 도입되어 시도되고 있는 단계이다.

최근에는, 실험동물이나 인간을 대상으로 하는 실험적 연구에서 전기 자극을 가하기 위한 조직 치유부 내로 직접적인 전극의 삽입을 통해 야기되는 감염 등의 2차적인 위해성이 문제가 되었다. 그래서 이러한 단점을 줄이기 위해 non- invasive bioelectrical therapy에 대하여 그 연구분야가 확대되었다. 그러한 예로, Bassett[14-16, 34]은 한 쌍의 Helmholtz coil을 이용하여 자기장을 형성하여 전기장을 유도하는 magnetically induced field를 이용하여 골절부를 치료하였다고 보고하였으며, Brighton 등[17]은 비유합성 골절부의 피부에 금속 전극판을 위치시킴으로써 형성되는 capacitively coupled field를 고안하여 전기 자극으로 이용한 바 있다.

한편, 골형성에 관련된 전기 자극의 긍정적 효과에 기인하여 치과영역에서의 활용을 위한 여러 연구들도 진행되었다. 그 중에서도 치주조직 재생의 부가적인 방법으로 전기 자극을 이용하기 위한 초기 연구들도 있었는데, Jacobs 등[21]은 비글견의 병적 골 결손부에 nanoampere 단위의 전류를 가하여서, 결손부 깊이가

임상적 혹은, 방사선학적으로 통계학적으로 유의성 있게 감소하지는 않았지만, 골수강 내로의 골 침착이 증가되었다고 보고한 바 있다. 다른 연구들에서는 10㎂의 전기 자극을 통해 개의 하악골에서 내부 골 개조가 증가되고[22], 실험적으로 형성된 수평 골 결손부에서 치조골이 재생되고[23], 그리고, 신생 백악질의 형성이 촉진되었다고 보고된 바 있었다[24]. 한편, Steffensen 등[25]은 23명의 환자를 대상으로 치주수술 후 전기 자극을 가한 실험군과 자극을 가하지 않은 대조군을 비교하였는데, 실험군에서 결손부 치조골 높이가 통계학적으로 유의성 있게 증가하였지만, 그 편차가 컸고 임상부착수준의 변화의 차이는 없었다고 보고하였다.

현재까지, 치주질환에 의해 파괴된 치주조직의 재생을 위해 전기 자극을 이용하는 것에 대해서는 그 연구가 아직 초기단계에 있으며, 그 결과들도 아직 미흡하여 체계적이고 일관된 결론을 내릴 수 있는 상태는 아니다. 전기 자극은 주로 골형성과 관련되어 골세포에 대해서 주로 연구되어 온 것이 사실이며, 그 자극에 의해서 골세포의 증식과 분화가 촉진될 수 있다고 받아들여지게 된 것도 사실이다. 이러한 결과에 근거하여 치주질환으로 파괴된 치조골의 효과적인 재생을 위해 실험적으로, 혹은 임상적으로 전기 자극을 시도한 연구들이 있었지만, 치주치료의 절대적 목표인 치주조직의 재생에는 치조골의 재생 외에도 다른 조직들의 부가적인 재형성을 필요로 하게된다. 파괴된 치주조직의 치유부에는 4가지의 다른 형태의 세포 즉, 치은상피세포, 치은섬유아세포, 골세포 및 치주인대세포 등이 이주해 올 수 있으며, 치근면으로 이주하는 세포의 표현형에 따라 치주조직의 치유형태가 결정된다고 할 수 있기 때문이다[35-37]. 이들 중 치은섬유아세포는 치은 결체조직 내에 존재하는 세포의 약 65 - 85%를 차지하고 미분화중배엽세포로부터 분화되어 여러 가지 섬유가 결합조직의 세포기질을 생성하며, DNA와 단백질도 생성함으로써 치주조직의 치유에 관여하는 것으로 알려져 있다[37]. 그리고, 치주인대세포는 섬유아세포, 골아세포, 파골세포, 백악아세포, 그리고 미분화 중배엽세포등을 포함하고 있으며, 치주인대세포만이 기능적으로 배열된 sharpey's fiber를 통해 신생 백악질과 신생 치조골에 삽입되는 신부착을 형성하여 치주조직의 재생에 기여한다고 알려져 있다[39, 40]. 그러므로 치주조직의 재생을 위해서는 치주인대세포가 다른 세포들보다 선행하여 이주하는 것이 중요하다고 할 수 있다. 그래서 본 연구에서는 전기 자극이 이들 치주인대세포와 치은섬유아세포에 미치는 영향에 대해서 실험하게 되었다.

본 연구에서는 예비실험 결과에서 밝혔듯이 세포의 자극을 위해 사용된 전류의 세기를 0.25, 1.0, 2.5 ㎂로 결정하였다. Becker 등[32, 41]은 전기 자극에는 세포활동을 개시시키는 역치가 존재한다고 보고하였고, 세포의 종류와 특성에 따라서 최적의 적정 전류세기가 존재한다고 하였다. Friendenberg 등[42]은 비유합성 골절을 전기 자극을 통하여 치유했다는 보고를 처음으로 하였는데, 그들의 이전의 골절치유에 응용한 전기 자극의 세기에 관한 연구에 근거하여 10㎂의 전류가 효과적이라고 하였다. 한편, Brighton 등[17, 43]은 10㎂전류는 부적절 하다고 하면서 20㎂의 전류가 효과적이라고 보고하였고, 다시 Friendenberg등[44]도 최대의 골반응을 일으킬 수 있는 전류는 20㎂정도이며, 30㎂ 이상의 전류는 골 괴사를 야기한다고 발표하였다. 그러나, Yasuda등[9]은 토끼의 대퇴골에서 1㎂의 전류가 골형성을 촉진시켰다고 보고한 바 있다. 일반적으로는 골 성장을 유발시킬 수 있는 전류의 범위는 5에서 20㎂의 범위를 가지는 것으로 알려져 있으며[18, 45], 전기 자극을 통해 골형성을 자극 할 수 있는 최저의 전류의 세기는 Baranowski 등[46]의 stainless steel 전극을 이용한 연구를 통해서 0.075㎂라고 보고된 바 있다.

본 연구의 결과에서는 치주인대세포와 치은

섬유아세포 모두에서 가해진 모든 세기의 자극(0.25, 1.0, 2.5㎂)에 반응하여 세포증식이 촉진된 것으로 나타났다. 그리고, 치은섬유아세포에서는 전기 자극의 전류 값에 따른 유의성 있는 차이가 나타나지 않았지만, 치주인대세포에서는 2.5㎂의 전류(실험3군)에서 더욱 증가된 세포증식을 일으켜서 2.5㎂의 자극이 다른 자극에 비해 더욱 효과적이라고 판단할 수 있다.

이러한 양상은 염기성 인산분해효소 활성도 측정에서도 관찰되는데, 치주인대세포에서는 모든 실험군에서 대조군보다 활성도가 증가한 것으로 나타났고, 2.5㎂의 제3군은 통계학적 유의성은 없었지만 가장 높은 수치를 나타내었다. 그리고, 치은섬유아세포에서도 실험3군에서만 염기성 인산분해효소의 활성도의 유의성 있는 증가가 나타난 것을 확인하였다. 한편으로, 조골 유사세포의 특성중의 하나인 염기성 인산 분해효소의 활성도가 치은섬유아세포보다 치주인대세포에서 더 높게 측정되었는데, 이는 이전의 다른 연구결과[30, 47, 48]와도 일치하는 것이었고, 이는 치주인대세포가 골아세포 표현형을 나타낸다는 것을 의미한다.

골세포와 연골세포 등을 대상으로 한 전기 자극에 대한 세포 반응에 관련된 많은 연구들에서는 전기 자극이 세포에 가해지게 되면, 세포막의 transmembrane potential의 탈분극(depolarization)이 유도된다고 하였다[49-55]. 특히, Wang 등[54, 55]은 전기 자극을 통해 배양액 혹은 조직환경에서 전기 화학적 반응이 일어나게 되고, 전극 중 음극에서의 전기분해로 인한 OH^-기 등의 전기화학반응 부산물의 생성 및 그에 따른 pH의 증가가 일어나게 되며, 그러한 반응 부산물들이 세포의 transmembrane potential의 탈분극을 직접적으로 유도한다고 제시하였다. 그리고, 탈분극된 세포막에서는 calcium ion channel이 개방되어 외부의 Ca^{2+} 이온이 세포 내로 유입되고, 이러한 Ca^{2+}이온은 세포 내에서 trigger effect로 작용하여 세포 내의 내형질 세망의 free calcium ion을 유리시킨다고 보고하였다. 한편, 전기 자극을 받은 세포 내의 증가된 Ca^{2+} 이온에 의해 세포 내의 일련의 반응이 야기되어 ATP 생성이 증가되고 세포 내로의 아미노산 유입이 촉진된다고 보고된 바 있으며, 이러한 반응을 통해 결과적으로 DNA 합성의 증가 및 교원질 합성의 증가, 그리고 비교원성 단백질의 합성 증가 등의 세포 활성이 야기된다고 알려져 있다[50, 52]. 또한, Fitzsimmons 등[56-58]은 병아리의 경골 조직의 배양 실험을 이용한 일련의 연구들에서 전기 자극에 의한 골세포 증식을 보고한 바 있는데, 전기 자극에 노출된 세포로부터 주변의 medium내로의 mitogen activity가 증가된다고 보고하였고, 이러한 mitogen activity는 부분적으로는 insulin-like growth factor II(IGF-II)의 mRNA의 증가 및 IGF-II의 세포 분비 증가라고 설명하였다.

본 연구에서 세포증식이나, 알칼리성 인산분해효소의 활성도 등에서의 전기 자극의 촉진효과는 어느 정도 판명되었으나, 단백질 함량의 측정에서는 치주인대세포나, 치은섬유아세포 모두에서 대조군과 각 실험군들과의 유의성 있는 차이가 발견되지 않았고, 각 실험군간의 차이도 없었다. 세포 활성에 의한 단백질 합성도 증가하리라는 것이 일반적 견해이지만, 치은섬유아세포의 실험3군이 대조군에 비해 미비하게 단백질 함량이 증가했다는 것을 제외하고는 전체 대조군과 실험군과의 차이는 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 본 연구와 기존의 세포배양실험들에서의 전기 자극의 적용시간이나, 세포의 배양시간에서의 차이 때문이라고 생각된다. 본 실험에서의 실험조건과 같이 전기 자극을 단 시간동안 가하고, 단 기간 세포배양을 하지 않고, 일정시간 간격으로 적정한 시간동안 전기 자극을 가하면서 좀 더 긴 기간동안 배양하는 실험조건을 이용한 연구도 필요하다고 생각되며, 그러한 실험조건에서는 본 실험의 결과와 다른 결과가 나올 수 있을 것으로 생각된다.

그리고, 실험에 사용된 전극의 성분에 따른

세포 반응의 차이에 대한 부가적인 연구도 필요하다고 생각된다. 기존의 전기 자극을 이용한 연구들에서는 주로 백금(platinum), cobalt-chrome합금, 은(silver), stainless steel, titanium, filamentous carbon fiber 등을 전극으로 이용하였다.

Spadaro[59]는 이러한 전극의 종류에 따른 골 형성 촉진 정도의 차이에 대해 언급하였는데, 낮은 전류(0.02㎂)에서는 백금(platinum), cobalt-chrome합금, 그리고 은(silver) 등의 전극이 효과적이었고, 높은 전류(0.2㎂)에서는 stainless steel과 titanium 전극이 효과적이었다고 보고한 바 있다. 한편, filamentous carbon fiber 전극은 부식되지 않으며 foreign body reaction을 일으키지 않는다는 보고도 있었고[60], 은(silver) 전극은 부가적으로 세균 성장에 대한 억제효과가 우수하였다는 보고도 있었다[61]. 이러한 전기 자극에 이용되는 전극의 재료는 생체에 무해한 biomaterial이어야 하며, 전기분해에 의해 독성산물이 유출되어서는 안된다. 그러므로 본 연구에서는 제외되었지만, 세포 배양액 혹은 생체조직에 직접 삽입된 전극이 전류에 의해 전기 분해되면서 유출되는 반응산물의 유해성과, 배양액 혹은 조직환경의 변화 등에 대해서도 보다 깊은 연구가 필요하다고 생각된다.

지난 수 십 년 동안 전기 자극에 의한 골 조직의 치유 및 재생에 관련된 실험적 연구와 임상적 연구, 그리고 세포적 수준에서의 생리학적, 전기생화학적, 분자생물학적 연구들이 진행되면서 많은 이론적 배경이 제시되었지만, 아직까지도 확립되고 체계화된 이론이 형성되지는 못한 것이 지금의 현실이다. 이러한 전기 자극을 치주질환에 의해 파괴된 치주조직의 재생에 응용하기에는 아직까지 축적된 이론과 기술이 역부족한 상태이다. 그러므로, 전기 자극을 임상에 도입 할 수 있기까지는 동일세포가 아닌 여러 다른 세포가 혼합되어 각기 다른 기능을 수행하는 치주조직의 특성을 고려하여, 모든 세포의 증식과 분화를 조화롭게 활성화시키고 조절할 수 있는 전기 자극의 적정 세기에 관한 연구, 자극을 적용하는데 필요한 방법론적 연구, 부작용에 관한 연구, 그리고 이의 적용에 근거가 되는 분자생물학적, 세포적, 그리고 임상적인 이론의 확립 등 많고 세분화된 분야의 문제점들이 해결되어야하며, 최종적으로는 이를 의사와 환자가 임상에서 손쉽게 이용할 수 있는 임상용 전기 자극기의 개발을 위한 기술 축적 등 지속적이면서 다각도의 연구가 필요하다고 생각된다.

V. 결론

전기 자극이 골세포의 증식과 분화를 촉진시켜 골 조직의 치유 및 재생을 촉진시킬 수 있다는 많은 실험적 증거와 이론에 근거하여, 치주질환으로 파괴된 치주조직의 재생에서 중요한 기능을 지니는 치주인대세포와 치은섬유아세포에 전기 자극이 미치는 영향을 알아보고, 이를 토대로 전기 자극의 임상적용 잠재성을 평가하기 위해 본 연구를 실시하였다.

전신건강이 양호한 성인에서 초기 배양한 치주인대세포와 치은섬유아세포를 대상으로, 각각 0.25, 1.0, 2.5㎂의 전기 자극을 12시간 동안 가한 군을 제 1, 2, 3 실험군으로 하고, 전기 자극을 가하지 않고 표준 배양액에서 배양시킨 군을 대조군으로 하여 세포 분주 후 24시간 뒤에 실험군에 전기 자극을 가하고, 분주 후 4일째(전기자극 종료 후 60시간 추가 배양)에 세포를 처리하여 각각의 세포에서 세포 증식, 단백질 함량, 알칼리성 인산분해효소 활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치주인대세포와 치은섬유아세포 모두에서 대조군에 비해 모든 실험군에서 세포 증식이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였으며, 치은섬유아세포에서는 각 실험 1, 2, 3군간의 유의성 있는 차이가 없었지만,

치주인대세포에서는 실험군들 중에서 실험3군이 실험1, 2군에 비해 유의성 있게 세포 증식이 증가하였다($p < 0.05$).

2. 치주인대세포나, 치은섬유아세포 모두에서 대조군과 실험군간의 단백질 함량의 유의성 있는 차이는 없었다.
3. 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소의 활성도는 대조군에 비해 모든 실험군이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였으나($p < 0.05$), 각 실험군간의 유의성 있는 차이는 없었다. 그리고, 치은섬유아세포에서는 대조군에 비해 실험3군에서만 알칼리성 인산분해효소의 활성도가 유의성 있게 증가하였다.

결론적으로, 전기 자극은 이미 알려진 바와 같이 골세포의 증식 및 분화, 그리고 이를 통한 골 조직의 치유와 재생에 영향을 줄 뿐 아니라, 본 실험을 통해 치주인대세포와 치은섬유아세포 등의 치주조직세포의 활성을 증가시킬 수 있어, 상실된 치주조직의 재생이라는 치주치료의 궁극적 목표를 위한 임상적 활용의 잠재성이 높은 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Caton, J. G., and Greenstein, G. : Factors related to periodontal regeneration. Periodontol. 2000, 1 : 9 - 15, 1993.
2. Brunsvold, M. A., and Mellonig, J. T. : Bone grafts and periodontal regeneration. Periodontol. 2000, 1 : 80 - 91, 1993.
3. Yukna, R. A. : Synthetic bone grafts in periodontics. Periodontol. 2000, 1 : 92 - 99, 1993.
4. Terranova, V. P., and Wikesj U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium : A review. J. Periodontol., 58 : 371 - 380, 1987.
5. Caffesse, R. G., and Qui ones, C. R. : Polypeptide growth factors and attachment proteins in the periodontal wound healing and regeneration. Periodontol. 2000, 1 : 69 - 79, 1993.
6. Hartshorne, E. : Pseudarthrosis. Am. J. Med. Sci., 1 : 121, 1841.
7. Yasuda, I., Nagayama, H., and Kato, T. : Fundamental problems in the treatment of fracture. J. Kyoto Med. Soc., 4 : 395 - 406, 1953.
8. Fukuda, E., and Yasuda, I. : On the piezoelectric effect of bone. J. Physiol. Soc. Jpn., 12 : 1158 - 1162, 1958.
9. Yasuda, I., Noguchi, K., and Sata, T. : Dynamic callus and electrical callus. J. Bone Joint Surg., 27A : 1292 - 1297, 1955.
10. Zengo, A. N., Bassett, C. A. L., Pawluk, R. J., and Prountzos, G. : In vivo bioelectric potentials in the dentoalveolar complex. Am. J. Orthod., 66 : 130 - 138, 1974.
11. Cochran, G. V. B., Pawluk, R. J., and Bassett, C. A. L. : Stress generated electric potentials in the mandible and teeth. Arch. Oral Biol., 12 : 917 - 922, 1967.
12. Fukada, E., Toshiaki, T., and Yasuda, I. : Callus formation by Electret. Jpn. J. Appl. Physiol., 14 : 2079 - 2083, 1975.
13. Bassett, C. A. L., Pawluk, R. J., and Becker, R. O. : Effects of electrical currents on bone in vivo. Nature, 204 : 652 - 658, 1964.

14. Bassett, C. A. L., Pawluk, R. J., and Pilla, A. A. : Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields ; A surgically non - invasive method. Ann. N.Y. Acad. Sci., 238 - 243, 1974.
15. Bassett, C. A. L., Pawluk, R. J., and Pilla, A. A. : Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. Science, 184 : 575 - 577, 1977.
16. Bassett, C. A. L., Pilla, A. A., and Pawluk, R. J. : A non - operative salvage of surgically resistant pseudoarthroses and non - unions by pulsing electromagnetic fields ; A preliminary report. Clin. Orthop., 124 : 128 - 142, 1977.
17. Brighton, C. T., Friendenberg, Z. B., Mitchell, E. I., and Booth, R, E. : Treatment of non - union with constant direct current. Clin. Orthop., 124 : 106 - 123, 1977.
18. Spadaro, J. P. : Electrically stimulated bone growth in animals and man. Clin. Orthop., 122 : 325 - 332, 1977.
19. Norton, L. A. : Implications of bioelectric growth control in orthodontics and dentistry. Angle Orthod., 45 : 34 - 45, 1975.
20. Davidovitch, Z., Shanfeld, J., Iannacone, W., and Korostoff, E. : Enhancement of orthodontic tooth movement in cats by locally applied electric currents. J. Dent. Res., 56 : 588 - 592, 1977.
21. Jacobs, J. D., and Norton, L. A. : Electrical stimulation of osteogenesis in pathological osseous defects. J. Periodontol., 47 : 311 - 319, 1976.
22. Karaki, R. : Experimental study of internal remodeling and callus formation in mandible by electrical stimulation. J. Kyushu. Dent. Soc., 32 : 590 - 608, 1979.
23. Kubota, K. : Effect of electrical currents on alveolar bone defects. J. Kyushu. Dent. Soc., 36 : 64 - 81, 1982.
24. Karaki, R., Kubota, K., Hitaka, M., Yamaji, S., and Yamamoto, H. : The effect of currents on new cementum formation during periodontal wound healing. J. Kyushu. Dent. Soc., 23 : 598 - 609, 1981.
25. Steffensen, B., Caffesse, R. G., Hanks, C. T., Avery, J. K., and Wright, N. : Clinical effects of electromagnetic stimulation as an adjunct to periodontal therapy. J. Periodontol., 59 : 46 - 52, 1988.
26. 박준봉, 허인식, 이혜자, 최영철 : 전기적 자극이 배양 두개관 골세포의 석회화에 미치는 영향에 관한 연구. 대한치주과학회지, 27 : 949 - 961, 1997.
27. Matsunaga, S. : Histological and histochemical investigations of constant direct current stimulated intramedullary callus. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 60 : 1293 - 1303, 1986.
28. Matsunaga, S., Sakou, T., and Yoshikuni, N. : Intramedullar callus induced by weak direct current stimulation ; Serial changes in the alkaline phosphatase activity at the site of electricity induced callus formation. J. Jpn. Bioelect. Res. Soc., 2 : 67 - 71, 1988.
29. McLeod, K. J., Donahue, H. J., Levin, P. E., Fontaine, M. A., and Rubin, C. T. : Electric field modulate bone cell function in a density - dependant manner. J. bone Miner. Res., 8 : 977 - 984,

1993.
30. Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm, G. R., and Foster, R. A. : A comparative study of human periodntal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. J. Dent. Res., 67 : 66 - 70, 1988.
31. Smith, S. D. : Effects of electrode placement on stimulation of adult frog limb regeneration. Ann. N.Y. Acad. Sci., 238 : 500 - 507, 1974.
32. Becker, R. O. : Electrical osteogenesis - pro and con. Calcif. Tissue Res., 26 : 93 - 97, 1978.
33. Lavine, L. s., Lustrin, I., Shamos, M. H., and Moss, M. L. : The influence of electric current on bone regeneration in vivo. Acta. Orthop. Scand., 42 : 305 - 314, 1971.
34. Bassett, C. A. L. : Pulsing electromagnetic fields ; A new method to modify cell behavior in calcified and noncalcified tissues. Calcif. Tissue Int., 34 : 1 - 8, 1982.
35. Lindhe, J. : Textbook of clinical periodontology, 2nd ed., Munksguard, p. 450, 1989.
36. The American Academy of Periodontology : Proceedings of the world workshops in clinical periodontics., vol. 20, 1989.
37. Melcher, A. H. : On the repair potential of periodontal tissues. J. Periodontol., 47 : 256 - 260, 1976.
38. Mariotti, A., and Cochran, D. L. : Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and

gingiva. J. Periodontol., 61 : 103 - 111, 1990.
39. Polson, A. M. : The root surface and regeneration ; Present therapeutic limitations and future biologic potentials. J. Clin. Periodontol., 13 : 995 - 999, 1986.
40. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성상에 관한 비교. 대한구강생물학회지, 15 : 14 - 28, 1991.
41. Becker, R. O., and Murray, D. G. : A method for producing cellular differentiation by means of very small electric currents. Ann. N.Y. Acad, Sci., 29 : 606 - 610, 1967.
42. Friendenberg, Z. B., Harlow, M. C., and Brighton, C. T. : Healing of non - union of the medial malleolus by means of direct current ; A case report. J. Trauma, 11 : 883 - 889, 1971.
43. Brighton, C. T., Black, J., Friendenberg, Z. B., Esterhai, J. L., Day, L. J., and Connolly, J. F. : A multicentre study of the treatment of non - union with constant direct current. J. Bone Joint Surg., 63 : 1 - 13, 1981.
44. Friendenberg, Z. B., Zemski, M. D., Pollis, L. P., and Brighton, C. T. : The responce of non traumatized bone to direct current. J. Bone Joint Surg., 56 : 1023 - 1030, 1974.
45. Alexa, O. : Electrically induced osteogenesis II ; Experimental studies. Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Lasi., 100 : 62 - 65, 1996.
46. Baranowski, T. J. Jr., Black, J., Brighton, C. T., and Friendenberg, Z. B. : Electrical osteogenesis by low direct current. J. Orthop. Res., 1 : 120 - 128, 1983.
47. 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.
48. Yorimasa, O., Naomi, N., Takeshi, S., Shunsuke, F., and Hiroshi, S. : Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. J. Periodontol., 66 : 1025 - 1031, 1995.
49. Rodan, G. A., Bourret, L. A., and Norton, L. A. : DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. Science, 199(4329) : 690 - 692, 1978.
50. Cheng, N., Van Hoof, H., Bockx, E., Hoogmartens, M. J., Mulier, J. C., De Dijcker, F. J., Sansen, W. M., and De Loeker, W. : The effect of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport of rat skin. Clin. Orthop., 171 : 264 - 272, 1982.
51. Nessler, J. P., and Mass, D. P. : Direct - current electrical stimulation of tendon heal - ing in vitro. Clin. Orthop., 217 : 303 - 312, 1987.
52. Ozawa, H., Abe, E., Shibasaki Y., Fukuhara, T., and Suda, T. : Eletric fields stimulate DNA synthesis of mouse osteoblast - like cells(MC3T3 - E1) by a mechanism involving calcium ions. J. Cell Physiol., 138 : 477 - 483, 1989.
53. Cowin, S. C., Moss - Salentijn, L., and Moss, M. L. : Candidates for the mechanosen - sory system in bone. J. Biomech. Eng., 113 : 191 - 197, 1991.
54. Wang, Q., Xie, Y., Zhong, S. Z., and Zhang, Z. Q. : The electrochemical reactions in

tissue culture medium under direct current stimulation. Chin. J. Bioeng., 11 : 143 - 146, 1994.
55. Wang, Q., Zhong, S. Z., Ouyang, J., Jiang, L., Zhang, Z. Q., Xie, Y., and Luo, S. : Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. Clin. Orthop., 348 : 259 - 268, 1998.
56. Fitzsimmons, R. J., Farley, J. R., Adey, W. R., and Baylink, D. J. : Embryonic bone matrix formation is increased after exposure to a low - amplitude capacitively coupled electric field, in vitro. Biochem. Biophys. Acta., 882 : 51 - 56, 1986.
57. Fitzsimmons, R. J., Farley, J. R., Adey, W. R., and Baylink, D. J. : Frequency dependance of increased cell proliferation, in vitro, in exposures to a low - amplitude, low - frequency electric field ; Evidence for dependence on increased mitogen activity released into culture medium. J. Cell Physiol., 139 : 586 - 591, 1989.
58. Fitzsimmons, R. J., Strong, D. D., Mohans, S., and Baylink, D. J. : Low - amplitude, low - frequency electric field - stimulated bone cell proliferation may in part be mediated by increased IGF - II release. J. Cell Physiol., 150 : 84 - 89, 1992.
59. Spadaro, J. A. : Electrically enhanced osteogenesis at various metal cathodes. J. Biomed. Mater. Res., 16 : 861 - 873, 1982.
60. Zimmerman, M., Parson, J. R., Alexander, H., and Weiss, A. B. : The electrical stimulation of bone using a filamentous carbon cathode. J. Biomed. Mater. Res., 18 : 927 - 938, 1984.
61. Uezono, H : Effect of weak direct current with silver electrodes on bacterial growth. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 64 : 860 - 867, 1990.

- Abstract -

Effect of the Electrical Stimulation on the Human Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts

Wook Lee, Joon - Bong Park, Man - Sup Lee, Young - Hyuk Kwon
Department of Periodontology, Division of Dentistry, Graduate School, Kyung Hee University

On the basis of the evidences that electrical stimulation could enhance proliferation and differentiation of bone cells and promote healing and regeneration of bone, this study was performed to investigate the effects of electrical stimulation on human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, which also have important roles in regeneration of periodontium, and to evaluate the potential of clinical application of electrical stimulation.

Human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts were primarily cultured from the root surface of extracted premolar and the adjacent gingiva without periodontal diseases. In control group, the cells(5×10^4 cells/ml) were incubated only in Dulbecco's Modified Eagle's Medium contained with 10% fetal bovine serum. In test groups, electrical stimulation was given at the current intensity of 0.25μA(test group 1), 1.0μA (test group 2), and 2.5μA(test group 3) for 12 hours to the same culture media with the control group. After 12 hour exposure of electrical stimulation, the cells were incubated for 2 and a half days(60 hours), and then each group of cells was analyzed for cell proliferation, protein level, and activity of alkaline phosphatase.

The results were as follows ;

1. The Rate of cell proliferation of every test group increased significantly in both periodontal ligament cells and gingival fibroblasts, and in periodontal ligament cells, test group 3 showed significantly increased proliferation compared to the other test groups($p<0.05$).
2. In the protein levels, neither periodontal ligament cell nor gingival fibroblast showed statistically significant differences between control and test groups.
3. The activity of alkaline phosphatase in periodontal ligament cells increased significantly in all test groups($p<0.05$), but there were no significant differences between 3 test groups. In gingival fibroblasts, the activity of alkaline phosphatase increased significantly only in test group 3($p<0.05$).

From the above results, it is concluded that electrical stimulation may have beneficial effects on the regeneration of destructed periodontal tissue in regard of the stimulation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts as well as electrically stimulated bone formation that has been known, and that electrical stimulation may

have the potential of clinical application.