

실험적 치아이동시 glycosaminoglycan의 발현에 관한 연구

이경환¹⁾ · 이종진¹⁾ · 강경화¹⁾ · 김은철²⁾ · 김상철³⁾

치아이동시 골대사에 있어 glycosaminoglycan의 역할에 대해 알아보고자 glycosaminoglycan의 주요 구성 성분인 chondroitin 4-sulfate(CH-4S)의 치주조직 내에서의 면역반응 정도 및 분포 양상을 백서 치아의 실험적 이동 과정에서 면역조직화학적으로 관찰하였다. 또한 사람 치주인대세포를 배양하여 여러 종류의 cytokine을 투여한 후 CH-4S의 발현 양상의 변화를 Western blot analysis를 통해 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치아이동에 반응하는 치수, 치주인대, 골모세포, 파골세포, 골세포 부위에서의 CH-4S 발현이 대조군보다 많았으나 상아질, 백악질에서의 CH-4S의 발현은 견인력 적용 기간에 관계없이 대조군과 큰 차이가 없었다.
2. 치수에서 CH-4S의 발현은 교정력을 가한 1일째에 크게 증가하였다가 7일째부터 감소되었으며 14일째에는 대조군과 차이가 없었다.
3. 치주인대에서 CH-4S의 발현은 주로 치조골 면을 따라 견인측에서 나타났는데 교정력을 가한 1일째에 가장 많은 발현을 보인 후 4일째부터 감소하기 시작하였다.
4. 골모세포와 파골세포 및 골세포에서 CH-4S의 발현은 4일째에 가장 많은 발현을 보였고 7일째 이후에는 크게 감소하였다.
5. 치주인대세포에 PDGF-BB를 투여한 경우 3일째에 가장 많은 CH-4S의 발현을 보였다.
6. 치주인대세포에 TNF- α 처리 시 배양 1일째에 CH-4S의 발현 감소를 보였다.
7. 치주인대세포에 PDGF-BB와 TGF- β 를 혼합 투여한 경우가 PDGF-BB 및 TGF- β 를 단독 투여한 경우 보다 배양 3일째에 CH-4S의 발현이 많았고 LPS나 TNF- α 투여군은 유사한 발현 감소를 보였다.

이상과 같이 교정적 치아이동시 시기 및 부위에 따라 glycosaminoglycan의 발현이 차이를 보이며, 치주인대세포에서도 cytokine의 자극에 따라 glycosaminoglycan의 발현이 변화하는 것으로 보아, glycosaminoglycan이 골대사에 있어 중요한 조절 인자로서의 역할을 하는 것으로 여겨진다.

(주요 단어 : 치아이동, 치주인대세포, 골대사, glycosaminoglycan, chondroitin(CH) 4-sulfate)

1. 서 론

치아에 교정력을 가하면 치조골과 치주인대를 비롯한 모든 치주조직에 변화가 초래되어, 압박측에서는 파골세포의 활성 증가로 골의 흡수가 일어나고, 견인측에서는 골모세포의 활성 증가에 따른 골침가가 일어나는 골의 개조와 함께 치아이동이 이루어진다¹⁾.

¹⁾ 원광대학교 치과대학 치과교정학교실, 대학원생.

²⁾ 원광대학교 치과대학 구강병리학교실, 조교수.

³⁾ 원광대학교 치과대학 치과교정학교실, 교수.

교신저자 : 김상철

전북 익산시 신륵동 344-2

원광대학교 치과대학 / 063-850-1960

sangkim@wonkwang.ac.kr

치주인대는 섬유성 결합조직으로서 분화 정도가 다양한 섬유모세포, 골모세포, 파골세포, 백악모세포 및 그 전구세포들이 혼합되어 있다²⁾. 교정력에 의한 기계적 자극으로 골 생리에 변화가 발생하면³⁾, 치주인대세포를 매개로 하는 골조직의 개조(bone remodeling)가 일어난다. 따라서 치주인대 내 교원섬유의 변성 및 재생이나 골개조 활성화에 대한 연구가 중요하다고 보고되었으나⁴⁾ 그 이전에 대한 포괄적인 지식의 확충이 필요한 실정이다.

결체조직은 소수의 세포와 많은 양의 거대 분자가 복잡하게 그물 모양으로 얽혀 있는 세포와 간질로 이루어져 있다. 섬유모세포에서 합성되어 분비되는 두 가지의 주된 세포의 거대 분자가 세포와 간질의 주된 성분이다. 첫째는 다당류 사슬인 glycosaminoglycan (GAG)과 GAG가 단백질에 공유결합으로 연결된 proteoglycan(PG)이며, 둘째로 교원섬유나 탄력섬유 같은 섬유성 단백질과 fibronectin, laminin 같은 세포 및 세포의 결합에 관여하는 물질을 들 수 있다⁵⁾.

PG는 연골 및 골의 세포와 간질에서 중요한 거대 분자 성분으로 알려져 있고 양이온적 특성 때문에 결체조직의 여러 가지 생리적 성질을 유지하거나, 조직 내 세포 조절에 중심적 역할을 한다고 보고되었다⁶⁾. 또한 PG는 교원질 섬유와 결합하여 관절 또는 뼈에 대한 압박력 및 장력, 전단 응력에 대한 지지 역할을 한다고 알려져 있지만 정확한 기능은 아직 모른다⁶⁾.

GAG는 반복성 이당류의 기본 구조를 갖는 선상 구조의 다당류로서, hyaluronic acid 및 chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparan sulfate, keratan sulfate 등 당 잔기의 성분에 따라 5가지로 나뉘어진다⁶⁾. 생체 내에서 GAG의 역할은 매우 다양해 교원질 합성과 그 배열의 조절⁷⁾, 세포의 물질과 영양 운반의 조절, 세포의 수분의 평형상태 유지, 동맥벽의 지질 침착 과정의 조절 기능, 암세포의 분화 및 압조각과 주위 조직과의 상호작용 조절, 사구체 기저막의 여과 기능 조절 그리고 세포와 간질 사이의 유착 조절 등에 중요한 역할을 한다고 보고되었다⁸⁻¹⁰⁾.

실험적인 치아이동시 치주인대 내에서 GAG에 관한 연구는 많지 않으나, 치주인대^{11,12)} 나 배양된 치주인대섬유모세포¹³⁾에서 GAG의 존재가 생화학적 분석에 의하여 보고되었고, GAG는 하나의 결체조직 성분이므로 기계적인 자극에 의한 조직 내 골개조에 관련될 수 있을 것으로 보고되었다¹⁴⁾.

Chondroitin sulfate는 여러 포유류의 치주조직에서 GAG의 주요 구성 성분 중 하나로 chondroitin 4-

sulfate(CH-4S)와 chondroitin 6-sulfate(CH-6S)로 분류된다. 이들 CH-6S나 CH-4S의 농도나 분포는 수화(hydration)의 정도와 관련이 있기 때문에 결체조직의 구조 형성에 중요한데 그 분포에 대하여 많은 논란이 있다^{12,15,16)}. 특히 Kagayama등¹⁷⁾은 CH-6S가 교정력을 가한 백서의 치주인대의 압박측에서 발현되지만 CH-4S는 발현되지 않는다고 하였다. 따라서 골개조에 의한 치아이동에서 chondroitin sulfate 발현의 분포 및 시간에 따른 발현 변화를 관찰할 필요가 있을 것으로 생각되며 이를 통해 GAG의 역할을 어느 정도 구명할 수 있을 것으로 보인다. 한편, 골조직 세포의 증식, 분화 및 활성화는 cytokine과 같은 국소적 인자에 의하여 조절되고 있다¹⁰⁾. 이중 transforming growth factor-beta(TGF- β)와 platelet-derived growth factor(PDGF)는 간엽세포의 증식을 조절하는 기능이 있는 것으로 알려진 성장인자단백질이며¹⁸⁾, lipopolysaccharide(LPS), interleukin-1과 interleukin-6, tumor necrosis factor(TNF) 등이 골흡수나 파괴에 영향을 미치는 cytokine으로 알려져 있다¹⁹⁾. 이러한 cytokine을 골개조에서 기본적인 역할을 하는 치주인대세포에 투여함으로써 GAG의 발현에 어떠한 변화가 발생하는지 밝혀내어 골대사에서의 GAG의 역할을 어느 정도 간접적으로 구명할 수 있을 것으로 생각한다.

따라서, 본 연구에서는 첫째, 견인력에 의한 치아이동 생체 모델에서 CH-4S의 면역조직화학적 발현의 정도 및 분포의 시간적 변화를 알아보고, 둘째, 배양된 치주인대세포에 TGF- β 및 PDGF-BB 등의 골형성 인자와 LPS 및 TNF 같은 골흡수 인자를 투여함에 따라 발생하는 CH-4S의 발현 변화를 Western blot analysis로 관찰하여, 골대사에 있어서의 GAG의 역할을 다소나마 구명하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1) 백서에서 견인력에 따른 GAG의 발현 변화

가) 백서의 사육 및 군 설정

체중 200g 내외의 생후 5주령인 Sprague-Dawley 계 백서 23마리를 연형 사료로 사육하였다. 이들을 대조군(3마리)과 실험군(20마리)으로 나누었으며, 실험군은 견인력을 가한 후 1일, 4일, 7일, 14일, 28일이 경과한 후 각각 4마리씩 희생시켰으며 대조군은 견인력을 가하지 않은 군으로 하였다.

나) 견인 스프링 장착

백서의 상악 전치를 원심으로 이동시키기 위하여 helical spring(0.014" stainless steel)을 이용하였으며, tension gauge를 사용하여 발휘되는 견인력의 크기(75g)를 확인하였다. 염산 케타민(Ketalar, 유한양행, 한국)을 백서의 둔부에 주입하여(체중 kg당 5-10mg) 마취한 후, 상악 전치의 순면과 원심면에 1/4 round bur로 홈을 형성하여 helical spring의 유지에 도움이 되게 하였다. 상악의 양쪽 중절치의 원심면에 0.009" 결찰선을 이용하여 helical spring을 부착시키고, 하악 절치는 상악 절치의 마모와 장치의 손상을 피하기 위하여 절제하였다.

다) 광학현미경 표본제작 및 조직학적 염색

백서를 희생시킨 후, 전치가 포함된 상악을 전두면 방향으로 전치의 치경부위, 치근 중앙부위, 치근단 부위 및 구개 부위가 포함되도록 조직피를 만들어 2일간 10% 중성 포르마린 용액에 고정하고, 10% EDTA로 10일간 탈회한 후, 통상적인 방법에 의하여 탈수 및 파라핀 포매를 하였으며, 4-6 μ m의 박절 표본을 poly-L-lysine을 도포한 슬라이드에 부착하여 표본을 제작하였다. 교원섬유 및 치주인대섬유의 형태 관찰과 치주조직의 변화를 알아보기 위해 H & E, Masson's trichrome, Periodic acid Schiff(PAS) 염색을 시행하여 검경하였다.

라) 면역조직화학적 염색

면역염색은 LSAB(labelled streptavidin biotin, Dako Co, USA) kit를 이용하였는데 일차항체는 glycosaminoglycan중 chondroitin-4-sulfate(Chemicon Co, USA)를 사용하였고 발색은 aminoethyl carbazole(AEC, Zymed Co, USA)로 하였다. 염색은 Pro-beon plus 슬라이드(Fisher Co, USA)를 맞대어서 생기는 모세관현상원리를 이용한 Microprobe system(Fisher Co, USA)으로 실시하였다. 파라핀절편을 탈파라핀화 및 수화시킨 후 일차항체인 CH-4S를 1/50로 희석해 30분간, 이차항체(anti-mouse IgG, Vector Lab., USA)를 20분간 반응시켰다. streptavidin alkaline phosphatase로 20분간 처리한 후 AEC로 발색시킨 후 Harrison hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerin 도포 후 검경하였다. 음성대조군은 일차 항체 대신 생리식염수를 사용한 후 동일한 방법으로 염색하였다.

마) 면역조직화학적 염색결과의 판정

본포양상을 알아보기 위해 각 부위를 저배율로 관찰하여 염색양상이 미만성인가 혹은 특정 부위에 국한된 것인가를 판별하고 고배율로 세포의 어느 부위가 양성으로 나타나는 지를 관찰하였다.

반정량적 분석을 위하여 저배율에서 염색의 강도가 비교적 강한 부위를 선택하여 상대적인 발현 정도에 따라 세포들의 0%, 5%미만, 5-30%, 30-60%, 60% 이상 염색되었을 때 염색 정도를 -(음성)에서 \pm (경미), +(약양성), ++(중등도), +++(강양성)까지 5단계로 구분하였다.

2) 배양 치주인대세포에서 cytokine 투여에 따른 GAG의 발현 변화

가) 치주인대세포의 배양

본 연구에서 사용된 치주인대세포는 교정목적으로 발치를 시행한 염증이 없는 상태의 치은을 절제하여 얻었다. 치은 절제후 치은조직을 세절하여 60mm 조직배양용 접시에 5-6개 정도 위치시켰다. 약 30분간 37°C, 5% CO₂, 습도 100%의 배양기에서 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)과 1% 항생제(10,000units/ml penicillin G, 10,000 μ g/ml streptomycin, 25 μ g/ml amphotericin B 포함, Gibco, USA)가 들어 있는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) (Gibco, USA)을 3ml씩 첨가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 2-3일간격으로 배양액을 교환하였다.

단일세포층이 밀생에 도달했을 때 배양액을 제거하고 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 phosphate buffer solution(PBS)으로 2회 세척하였다. 부착이 안된 세포와 PBS를 제거하고 0.25% trypsin/EDTA (10 \times , Gibco, USA)를 2ml씩 넣고 3분간 clean bench에서 방치하여 부착세포를 분리시킨 후 15ml 원심분리용 시험관으로 옮겨 1,200 rpm으로 10분간 원침하였다. 원침 후 상층액을 버리고 PBS를 가하여 Vortex mixer로 혼합하여 세척한 후 다시 1,200rpm으로 10분간 원침하였다. 다시 상층액을 버리고 DMEM을 첨가하여 Vortex mixer로 혼합하여 세포부유액을 만들고 이를 60mm 배양접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였고, 계대 배양은 1:3-4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 5, 6회 계대 배양된 치주인대세포를 사용하였다.

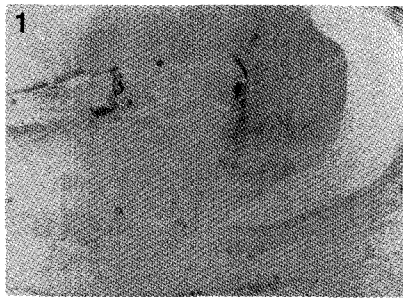


Fig. 1. Microphotography in control tissue shows negative or rare expression of Chondroitin 4-sulfate(CH-4S) in pulp, PDL and alveolar bone(X40).

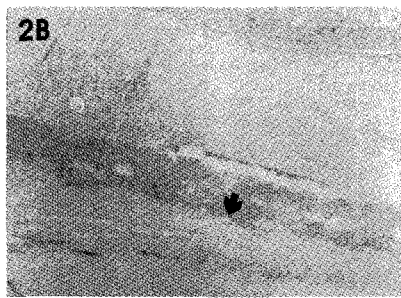


Fig. 2. Microphotography of 1-day tissue showing expression of CH-4S in periodontium near to the bone surface in tension side was intensively positive with CH-4S(A: X200), while PDL in pressure side was rare or weakly positive(B: X100).

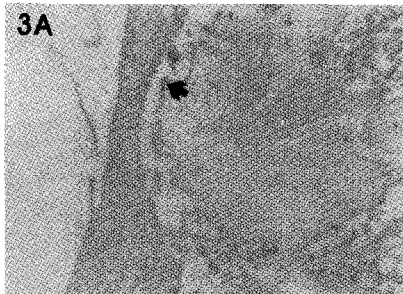
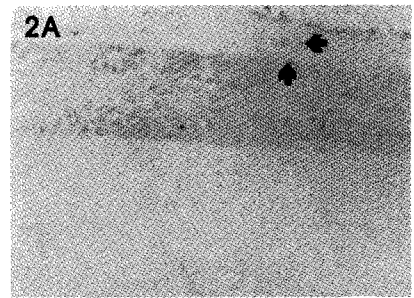


Fig. 3. Immunolabelling was decreased in periodontal ligament of tension side and was still a mild in the tension side periodontal ligament and osteoblasts(A: X100), but rare or weakly positive site of periodontal ligament tissue was relation with bone surface, in pressure side(B: X100).

나) Cytokine 투여

계대 배양된 치주인대세포를 60mm 배양접시에 분주하기 전 trypan-blue로 염색한 후 hemocytometer에 옮겨 도립현미경 상에서 세포 수를 세어서 배양접시 당 2×10^5 개의 세포수로 분주하고 2일간 배양을 실시하였다.

2일간 배양된 치주인대세포에 PDGF-BB(Sigma Co, USA, 30ng/ml), TGF- β (Sigma, Co, 20ng/ml), TNF- α (Genzyme, USA, 10ng/ml), LPS(Sigma, USA, 1 μ g/ml) 등의 cytokine을 단독 혹은 혼합 투여하여 1일, 2일, 3일간 배양하였다.

다) Western blot analysis

각각의 실험군 및 대조군에서 TRI reagent(Montgomery, USA)로 단백질을 추출한 후 Lowry방법으로 단백질을 정량 분석한 후 각 50 μ g을 취하여 SDS

-page와 western blotting에 사용하였다.

Protein standard marker(Promega, USA)와 단백질에 동량의 loading buffer를 첨가하고, 95 $^{\circ}$ C에서 denaturation 시켜서 8% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동한 후 Coomassie Blue 염색을 시행하였다. 전기영동한 gel을 nitrocellulose membrane(Millipore, USA)에 옮겨서, 3% skim milk에 한 시간 동안 blocking 하고 일차항체를 1:800으로 희석한 후 90분간 반응시켰다.

그 후 이차항체(alkaline-phosphatase conjugated anti-rabbit Ig G, Sigma Co)를 1시간 반응시켜 ECL (Amersham, USA) chemiluminescence detection kit를 이용하여 검출하였다.

라) Optical density(OD) 측정

Image Pro II program(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 검출된 필름의 optical density를 측정하였다.

III. 연구성적

1) 백서에서 견인력에 따른 GAG의 발현

대조군의 치주조직에서 chondroitin-4-sulfate(CH-4S)는 미만성으로 음성반응을 보였는데(Fig. 1), 구

Table 1. Expression of chondroitin-4 sulfate in pulp, cementum, and dentin according to duration in tooth movement of rat

	Pressure side				Tension side			
	Pulp	Cementum	Dentin	Odontoblasts	Pulp	Cementum	Dentin	Odontoblasts
Control	±	±	±	±	±	±	±	±
1-day	±	±	±	++	±	±	+	++
4-day	+	±	±	±	+	±	±	±
7-day	±	±	±	±	±	±	±	±
14-day	±	±	±	±	±	±	±	±
28-day	±	±	±	±	±	±	±	±

(± ; rare, + ; mild, ++ ; moderate)

Table 2. Expression of chondroitin-4-sulfate in bone and bone cells according to duration in tooth movement of rat

	Pressure side			Tension side		
	Bone matrix	Osteocyte	Osteoclasts	Bone matrix	Osteocyte	Osteoblasts
Control	±	±	±	±	±	±
1-day	±	+	+	±	±	+
4-day	±	++	+++	±	++	++
7-day	±	±	+	±	±	±
14-day	±	±	±	±	±	±
28-day	±	±	±	±	±	±

(± ; rare, + ; mild, ++ ; moderate, +++ ; heavy)

강상피, 상아세관, 전상아질, 치주인대, 치수, 치근단의 백악질과 백악모세포에서도 아주 경미하거나 음성에 가까웠고 치경부와 치근단, 근원심간의 차이도 없었다.

견인력을 가한지 1일째에서 CH-4S의 발현 부위 및 정도는 치주인대에서 압박측과 견인측간에 상당한 차이를 보였다. 치주인대 내부에서는 압박측보다 견인측의 치조골 인접부위에서 골면을 중심으로 강양성의 발현을 보였고(Fig. 2A, 2B) 치경부측보다는 치근부측에서 발현이 많았다. 또한 치조골의 기질에는 음성이었으나 골모세포 및 골세포, 치수혈관에서 많은 발현을 보였다.

4일째에서는 상아질, 백악질, 치수에서의 활성은 1일째와 차이가 없으나 치주인대에서의 발현은 견인측보다 압박측의 치근단 치주인대에서 발현이 약간 더 많이 관찰되었으나 1일째보다는 견인측에서도 크게 감소되었다(Fig. 3A, 3B). 골모세포와 골세포에 약양성의 발현을 보이고, 치근단 골면의 파골세포에서 강양성 반응을 보였다.

Table 3. Expression of chondroitin-4 sulfate in periodontal ligament according to duration in tooth movement of rat

	Pressure side	Tension side
control	±	±
1-day	+	+++
4-day	+	+
7-day	+	+
14-day	±	±
28-day	±	±

(± ; rare, + ; mild, +++ ; heavy)

7일째에는 상아질, 백악질에서는 4일째와 차이가 없었으나 치수에서 4일째보다 감소된 양상으로 나타났고, 치주인대에서 압박측보다는 견인측에서 발현이 약간 많았으며, 치경부와 치근단의 차이는 미약하였으며 전반적인 치주조직내 발현은 4일보다는 감소된 양상으로 나타났다.

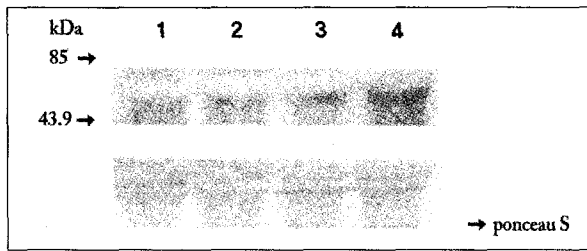


Fig. 4. Western blot analysis for the Chondroitin 4-sulphate in human periodontal ligament cells exposed to PDGF-BB for 1- 3-day. Same amount of cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel (kDa : kilodalton, Lane 1 : control, 2 : 1-day, 3 : 2-day, 4 : 3-day).

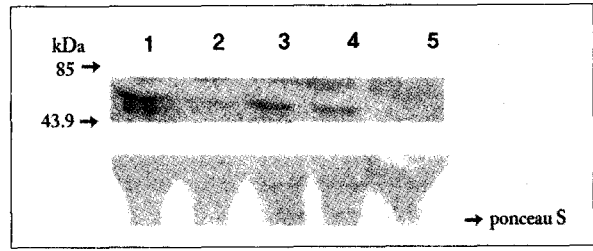


Fig. 5. Western blot analysis for the Chondroitin 4-sulphate in human periodontal ligament cells exposed to TNF- α for 1- 3-day. Same amount of cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel (kDa : kilodalton, Lane 1 : control, 2 : 1-day, 3 : 2-day, 4 : 3-day).

14일째에서는 골세포에서의 발현은 음성에 가까웠고, 견인측 및 압박측의 치주인대에서의 발현도 4일 및 7일째에 비해 크게 감소된 경미한 발현이 나타났고 압박측과 견인측의 차이가 없었으며 치수혈관에서의 발현은 7일째보다 크게 감소되어 대조군과 유사한 발현을 보였다.

28일째의 치수혈관, 치근단 백악모세포, 상아질, 상아모세포, 약간 붕합, 압박측 치주인대에서는 14일째와 큰 차이가 없어 경미한 정도로 발현감소가 되어 골과 치주인대의 경우 대조군과 비교하여 차이가 없었다(Table 1-3).

2) 배양 치주인대세포에서 cytokine 투여에 따른 GAG의 발현 변화

1. PDGF-BB 투여

대조군에서는 약 50kDa의 CH-4S 단백질이 발현되어 0.0182 \pm 0.0070의 OD값을 보였다. PDGF-BB투여 후 1일째는 0.0207 \pm 0.0022, 2일째는 0.0374 \pm 0.0062로 대조군보다 약간 증가하였으나 3일째에서 0.3007 \pm 0.1879로 CH-4S의 발현이 크게 증가하였다 ($p < 0.05$, Fig. 4).

2. TNF- α 투여

대조군에서는 약 50kDa의 CH-4S 단백질이 발현되었으며 OD값은 0.1039 \pm 0.0111 이었다. TNF- α 투여 후 1일째에는 대조군에 비해 발현 정도가 감소되어 0.0052 \pm 0.0011 이었으나($p < 0.05$), 2일째는 0.0784 \pm 0.0099, 3일째는 0.0998 \pm 0.0024로 1일째보다 증

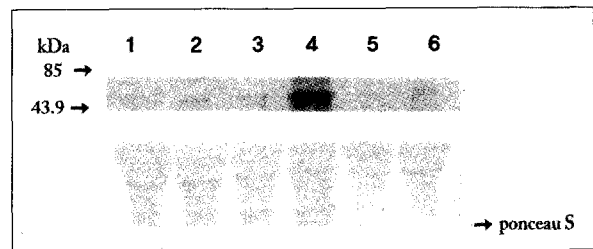


Fig. 6. Western blot analysis for the Chondroitin 4-sulphate in human periodontal ligament cells exposed to various cytokines for 3-days. Same amount of cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel (kDa : kilodalton, Lane 1 : no treated, 2 : TGF- β , 3 : PDGF-BB, 4 : TGF- β + PDGF-BB, 5 : LPS, 6 : TNF- α).

가되어 대조군과 유사한 정도를 보였다(Fig. 5).

3. 다른 cytokine의 투여

TGF- β 및 PDGF-BB 단독투여 후 3일간 배양한 경우 대조군의 0.0200 \pm 0.0154에 비해 2.8배 가량 증가된 0.0578 \pm 0.0363(TGF- β 투여), 0.0535 \pm 0.0411 (PDGF-BB 투여)의 발현을 보였으나, TGF- β 와 PDGF-BB를 혼합 투여한 경우 CH-4S의 발현이 대조군보다 7배 가량 증가한 1.4122 \pm 0.6437로 강하게 나타났다($p < 0.01$).

LPS를 투여한 경우는 대조군보다 발현이 적어 0.0055 \pm 0.0021이었으며 TNF- α 투여의 경우도 LPS 투여 경우와 유사하게 0.0096 \pm 0.0031로 발현이 감소되었다($p > 0.05$, Fig. 6).

IV. 총괄 및 고찰

교정적 치아이동시 압박측에서 파골세포가 나타나서 치조골을 흡수하고 견인측에는 골모세포가 나타나 신생골을 첨가하면서 골 내에서 치아가 이동하는 골개조가 일어난다.

골의 물리화학적 성분으로서 제일 중요한 요소는 교원질, 교원질 섬유소 및 이들과 서로 섞여 있는 PG나 GAG가 있다. PG는 결합조직의 구성성분으로, 이런 거대분자는 중심 핵 단백질로 구성되는데 하나 또는 그 이상의 GAG으로 공유결합되어 있고 기질의 PG 및 교원질은 연골세포 및 활액 사이에 삼투압 작용으로서 연골모세포, 연골세포의 세포질 내 수화작용을 조절하고 있다. 생역학적으로는 압박력, 장력 및 회전응력에 대해서 PG는 gel의 점성과 교원질섬유의 탄력성으로써 압박 변형에 적응을 하며 또 장력에 대해서도 잘 유지한다. 특히 관절연골은 회전운동시 동시에 발생하는 전단응력, 굴곡운동 및 회전운동에 대한 충격흡수 역할을 담당하고 있어 기질에서의 PG의 생성은 관절을 정상적으로 유지하는데 필수적이라고 알려져 있다²⁰⁾.

GAG는 다당류로서 hexosamine과 uronic acid로 구성된 이당류가 한 단위가 되어 반복, 연결되어 있으며 가장 풍부한 물질로 hyaluronic acid(HA)가 있다. 이는 glucuronic acid와 N-acetylglucosamine으로 구성된 non-sulfated GAG이다. glucuronic acid와 N-acetylgalactosamine 단위의 4번째 혹은 6번째 위치의 탄소가 황화된 chondroitin sulfate(CS)와 dermatan sulfate(DS)가 있다. 이외에 heparan sulfate(HS)와 극히 소량이지만 galactose와 N-acetylglucosamine으로 구성된 keratan sulfate가 있다⁷⁾.

GAG이나 PG는 정상 모발의 성장주기, 상처치유, 그리고 피부 노화과정과 같은 정상적인 생리적 변화에 중요하며²¹⁾, GAG의 분해효소의 결핍으로 초래되는 mucopolysaccharidosis⁸⁾외에, systemic sclerosis²²⁾, pseudoxanthoma elasticum²³⁾같은 fibrotic disorder, progeroid-like syndrome과 같은 유전성질환²⁴⁾, 종양침윤과 건선 등⁹⁾이 GAG 대사의 이상으로 초래될 수 있다고 알려져 있다. 또한 GAG의 생화학적 연구 방법에는 전기영동, 원심분리법, 액체크로마토그래피법, 단백질 항체를 이용한 immunoblot, 그리고 조직화학적 방법 등 연구자에 따라 여러 가지 방법이 보고되어 왔다²⁵⁾.

교원 섬유는 조직 내에서 외부의 장력에 저항하는

반면, GAG는 많은 양의 수분과의 결합을 통해 생기는 부력 때문에 외부로부터의 압력에 기계적으로 저항하는 힘을 세포의 간질에 부여한다. 아울러 세포의 간질의 높은 수분 함량은 수용성분자의 빠른 확산을 가능하게 하고 간질 내의 세포의 이동을 용이하게 한다⁶⁾. 실제로 GAG가 collagen fiber형성에 영향을 끼친다고 하며 collagen합성뿐만 아니라 섬유모세포의 증식에도 영향을 준다고 하였다²⁶⁾.

결체조직은 상당량의 세포외기질을 포함하고 있고, 교원섬유와 비교적 당단백 및 proteoglycan의 framework를 이룬다. 교원섬유는 비탄력적이고 GAG는 친수성이기 때문에 교원섬유는 견인력을 지지하고 GAG는 압박력에 저항한다²⁷⁾. 치주인대는 치아를 치조골에 지지하는데 견인력에 대한 필수적인 섬유조직이지만 치주인대에 가해지는 힘은 치근에 가해지는 힘의 방향이 여러 근육에 의해 만들어지는 힘에 의존하기 때문에 견인력에서 압박력까지 다양하다. 설치류 대구치에서 생리적 치아이동은 잘 알려졌지만 치근의 원심측 치조골은 흡수되고 근심측에서는 골이 형성된다^{15,28)}. 따라서 백서 구치 치주인대는 견인력과 압박력 하에 있는 결체조직의 조직학적 특징을 갖는 모델 중의 하나로 알려져 있어 백서에서 교정적 치아이동 모델은 골조직 개조를 보이는 것으로 특히 치주인대세포와 치조골 조직을 통해 재구성되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구의 주 관심사는 GAG중 CH-4S에 두고자 하였다.

본 연구에서 대조군의 CH-4S 발현은 치은, 상아질, 치주인대, 치수, 골세포에서 경미하였고 교정적 치아이동에 반응하는 치수, 치주인대, 골모세포, 파골세포, 골세포부위에서 CH-4S의 발현이 대조군에 비해 증가되는 것이 관찰되어 CH-4S가 주로 골이나 경조직 대사와 관련이 있음을 알 수 있었고 이러한 면역반응은 주로 세포질에서 반응산물이 관찰되었는데 이는 치아이동 후 세포의 세포질 내에서 면역반응이 국소화 되는 것은 바로 CH-4S 단백질이 세포질 내에서 새롭게 합성되었다고 여겨진다.

본 연구에서는 대조군 및 실험군의 치주인대에서 GAG의 특이 분포를 분석하였는데 Kagayama등¹⁷⁾은 CH-6S가 정상 백서 구치의 원심에 있는 치조골 면에 인접한 치주인대에서 발현되었는데 이 부위는 생리적 치아이동 중 치근의 압박측에 해당되기 때문에²⁸⁾ 치주인대에서 stress에 관련된 CH-6S의 분포라고 제안하였다. 또한 치주인대의 초자양화대와는 관련이 없었고 압박측 치주인대에서 볼 수 있다고 하여 압박

측에서 CH-6S의 과다 축적을 보고하였으며 치주인대에서 GAG를 조직화학적으로 연구하였으나 스트레스와 관련된 분포는 밝혀지지 않았고 다른 결체조직 즉 견인력에 조직이 저항하는데 필수적인 연골에서는 chondroitin sulphate가 다량 함유된다고 연구되어 왔다¹³⁾. 게다가 소의 flexor tendon에서 PG의 함유가 견인력만을 받는 건보다 견인 및 압박을 받는 건에서 3-5배 정도 높다고 하였기 때문에²⁹⁾ GAG의 분포가 견인 스트레스중 압박력과 밀접한 관련을 갖는다고 하였다. 그러나 CH-6S의 역할은 아직 연구된바 없었는데 Kagayama등¹⁷⁾의 연구는 압박과 관련된 CH-6S의 분포가 비초자화된 치주인대와 초자화 초기에서 발견되어 압박과 관련된 분포를 보인다고 제안하였다. 그러나 본 연구에서의 압박측 초자화대에서는 이러한 CH-4S의 발현이 거의 없어 이에 대한 연구는 향후 더 이루어져야 한다고 생각된다.

Kagayama등¹⁷⁾의 연구는 본 연구에서 보고자 했던 CH-4S와는 약간 다른 CH-4S/ dermatan sulphate가 골의 표면, 백악질, 전상아질, 골세포, 백악세포에서는 관찰되는 것은 다른 연구와 유사한데³⁰⁾ 압박력을 가한 실험군이나 대조군에서 치주인대에서 음성이라고 하여 CH-4S/DS가 CH-6S와는 달리 압박력과 관련된 변화에는 관련되지 않는다고 하였으나 본 연구에서는 CH-4S가 Fig. 3B나 4D에서처럼 골세포, 골모세포뿐 아니라 치주인대세포에도 압박 및 견인측에도 모두 관련되어 전혀 반대되는 결과를 보였는데 이러한 이유로써 Kagayama등¹⁷⁾의 연구는 10g의 힘을 가했을 뿐이고 본 연구는 이보다 7배의 힘이 가해진 실험군이기 때문에 발현 차이가 있다고 생각되고 CH-4S가 압박측에도 발현되었지만 견인측 치주인대에서도 큰 발현을 보여 치근에 가해지는 모든 힘의 방향에 따라 CH-4S가 다 반응한다고 생각된다.

본 연구에서의 CH-4S 단백질의 실험적 치아이동시 압박 및 견인측간에 비대칭적 분포는 즉 1일째에는 견인측이 압박측에 비해 발현이 많았고 4일째에는 견인측보다 압박측 치주인대에서 많으며 골모세포보다는 파골세포에 강한 발현을 보인 점은 CH-4S가 생체내 교정력에 대해 골흡수에 골모세포 및 치주인대세포가 밀접하게 관련된다는 것을 알려준다고 생각된다.

실험적 치아이동시에 견인측보다는 압박측에서의 교원질 발현이 증가하고 높은 신호 생산이 나타나므로(higher signal production)³¹⁾ 세포외기질 중 GAG는 활발한 골형성이나 골개조 동안에 섬유모세포와

골모세포를 연결할 수 있다. 본 연구결과는 CH-4S 단백질의 발현이 교정적 치아이동시 치주인대, 치수, 골 관련 세포에서 1일에서 7일까지 면역반응증가가 관찰되어 이러한 세포들간에 면역반응이동이 관찰되고 실험적 치아이동시 교정력을 통한 힘의 전달이 치주인대를 통해 골 관련 세포, 즉 골개조를 하는 시기의 세포에 전달되고 치주인대의 개조가 CH-4S발현과 밀접하게 관련되어 있다고 여겨진다.

골모세포는 골을 형성하는 세포로서 중요한 기능을 갖고 있을 뿐 아니라 골기질 내에 존재하는 transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor-1, cytokine, prostaglandin 등 골조직 대사의 국소조절물질을 생성하여 유리하는 것으로 알려지고 있다³²⁾. 골모세포로부터 생성된 이러한 물질들은 autocrine 또는 paracrine action을 통해 파골세포의 형성과 활성화, 골모세포의 증식 및 활성화 등 여러 종류의 골조직 세포대사활동을 조절한다고 한다³³⁾.

Transforming growth factor-beta(TGF- β)와 platelet-derived growth factor(PDGF)는 간엽세포의 증식을 조절하는 기능이 있는 것으로 알려진 성장인자 단백질이다¹⁸⁾. TGF- β 와 PDGF를 이용한 많은 생체외 연구에서 이들은 여러 가지 간엽세포들의 유사분열증식과 결합조직의 기질 단백질 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{34,35)}. 활성화된 PDGF단백질은 PDGF A-chain polypeptide와 PDGF B-chain polypeptide의 조합으로 구성되어 있어서 AA, BB, AB 등의 3가지 isoform을 만들어 낸다. 이들 isoform은 그들만의 독특한 PDGF 수용체 subunit를 가지고 있어서, PDGF 단백질 이량체들은 각각의 적절한 수용체 subunit와 결합하게 된다. PDGF-AB와 PDGF-BB는 창상 부위에서 혈소판과 대식세포에서부터 유래되어 여러 간엽세포들의 유사분열과 증식을 촉진시키며³⁶⁾, 또한 상처가 생기면 창상 부위의 섬유모세포와 상피세포들은 PDGF A-chain 유전자의 발현을 유도시키기도 한다³⁷⁾. 그리고 PDGF와 IGF-1을 혼합 투여하면 피부 창상의 치유를 촉진시키며³⁸⁾, 치주 창상 부위에서는 조직의 재생을 증진시키는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. TGF- β 는 창상 부위에서 혈소판과 대식세포에서 분비되며, 골성 조직도 TGF- β 의 커다란 저장고 역할을 하기 때문에 치주 창상의 치유기전에 있어서 중요한 기능을 하는 것으로 여겨진다³⁶⁾.

치아이동도 염증반응 및 골 치유 과정으로 여길 수 있기 때문에 치주인대세포에 cytokine자극이 치아이

동에 따른 치주인대세포를 매개로 하는 in vitro model로도 여길 수 있다고 생각되어 골형성인자와 골흡수인자를 투여하였다.

한편 in vitro에 사용되는 성장인자의 농도도 차이가 있는데 Oates 등⁴⁰⁾의 연구에서 TGF- β 1이 치주인대세포에 대해 매우 의미 있는 유사분열 효과를 나타냈지만 농도 변화 (1.0ng/ml 또는 10.0ng/ml)에 있어서는 별 다른 차이가 없었다고 하였다. 또한 이 연구에서 PDGF에 대한 치주인대세포의 유사분열 반응은 실험된 최고 농도인 50ng/ml까지 농도의존적 양상으로 계속 증가하였다. Pfeilschifter 등⁴¹⁾은 골기질의 침착 정도와 관련된 연구에서, 쥐의 두개골을 이용하여 실험실적으로 TGF- β 1의 효과를 측정 한 결과 0.1nM에서 10nM (250ng/ml)까지 농도의존적으로 증가하는 양상을 보였으며, 또한 PDGF도 1nM에서 10nM (320ng/ml)까지의 농도에서 계속 증가하였다. 한편 Dennison 등⁴²⁾의 연구에서도 10ng/ml의 TGF- β 1과 20ng/ml의 PDGF를 사용하여 치주인대세포와 치은 섬유모세포의 세포 증식을 측정 한 결과, 3일 후에 PDGF는 치은 섬유모세포의 증식을 증가시켰으며, TGF- β 1의 단독 투여 및 TGF- β 1과 PDGF의 혼합 투여는 치주인대세포의 증식을 가져온다고 하였다. 위와 같은 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 10ng/ml TGF- β 1과 20ng/ml PDGF-BB를 사용하였다.

치주조직에서 TGF- β 와 PDGF-BB를 각각 또는 혼합하여 사용한 후의 효과에 대해서는 지금까지 다양한 연구 결과가 있다. 초기의 생체 외 연구에서 Piche 등⁴³⁾은 치은 섬유모세포에 대한 TGF- β 의 투여로 최소한의 증식 촉진이 있었다고 하였고, PDGF가 치은 섬유모세포와 치주인대세포의 증식을 증가시킨다고 하였으며, 반면에 Piche와 Graves⁴⁴⁾의 연구에서는 TGF- β 가 치은 섬유모세포의 증식에 아무런 영향이 없다고 하였다. Oates 등⁴⁰⁾은 PDGF-AA와 PDGF-BB 모두 치주인대세포의 DNA 합성을 증가시켰으며, 어느 특정 농도의 TGF- β 도 치주인대세포의 증식을 일으킬 수 있다고 하였다.

본 연구에서 PDGF-BB를 치주인대세포에 투여한 결과 배양 3일 후에 CH-4S 단백질 발현이 대조군보다 증가하였는데 배양 1일째나 2일째보다 많았다. 그리고 CH-4S 발현은 TGF- β 1을 투여한 경우보다 PDGF-BB와 TGF- β 1을 혼합 투여한 경우가 더 많았는데 이는 치주인대세포가 성장인자의 자극에 의해 GAG가 더 많이 발현되어 CH-4S의 증가를 가져온 것으로 여겨진다.

Dennison 등⁴²⁾의 연구에서는 TGF- β 1 단독 또는 TGF- β 1과 PDGF를 혼합하여 사용하면 치은 섬유모세포에서보다 치주인대세포에서 더 많은 세포 증식이 있었던 반면에, PDGF를 단독으로 사용하면 치주인대세포보다 치은 섬유모세포의 증식을 더 많이 일으킨다고 하여 치주인대세포를 대상으로 한 본 연구의 결과를 뒷받침한다고 여겨지며 교정적 치아이동시 치유 과정 중에 이 두 성장인자를 적절히 사용하여 새로운 결합조직의 형성을 촉진할 수 있다고 생각한다.

cytokine은 국소적 생화학적 매개체로 작용할 수 있고 직접 또는 간접적으로 골세포와 상호작용을 한다. cytokine은 또한 표적세포에 의해 prostaglandin이나 IL-1⁴⁵⁾ 같은 많은 물질을 합성하거나 분비할 수가 있다. 골흡수나 파괴에 영향을 미치는 cytokine으로 interleukin-1과 interleukin L-6, tumor necrosis factor(TNF)등이 알려져 있다⁴⁹⁾. 그중 IL-1과 TNF- α 는 파골세포를 활성화시켜 골흡수를 일으키고 신생골의 생성을 억제하고, IL-1은 collagenase 합성을 유도한다고 보고되고 있다⁴⁵⁾. 또한 lipopolysaccharide(LPS)가 면역세포나 염증세포를 자극하여 만들어진 cytokine은 LPS가 섬유모세포를 자극할 때 IL-1을 생성할 수 있는 기폭제 역할을 하기 때문에, cytokine은 치주조직에서 염증세포와 면역세포를 활성화시켜 치조골 파괴를 일으킬 수 있다⁴⁶⁾. LPS는 polysaccharide, phospholipid 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며⁴⁷⁾, 세균의 급속한 성장시기나 세균의 외막이 손상된 경우에 유리되며⁴⁸⁾ 치주질환 시 조직 파괴의 중요한 원인요소로 알려져 있다.

본 연구에서 사용된 TNF- α 의 농도는 10ng/ml이었다. 1ng/ml 이상에서 농도의존적으로 골세포 활성이 감소하고 alkaline phosphatase 활성의 감소하며 파골세포 형성을 촉진할 수 있다고 한 Brnadstrom 등⁴⁹⁾이나 Lader 등⁵⁰⁾의 연구에 근거하였다. 또한 LPS도 Shao 등⁵¹⁾, Tam 등⁵²⁾이 실험에 이용한 1ug/ml의 농도를 선택하였다.

본 연구에서 치주인대세포에 TNF- α 처리시 배양 1일째에 CH-4S 발현 감소를 가장 두드러졌고 2일, 3일째에서는 대조군과 차이가 없는 발현 감소를 보였다.

본 연구결과에서 CH-4S가 이동하는 치아의 견인축과 압박축에서 모두 발현이 되었는데 이런 소견은 골세포뿐 아니라 치주인대세포에서도 세포 내 삼차원적 network의 부가적 연결을 통해 힘에 반응하는

것이라고 생각되고 생체 외 실험에서도 치주인대세포를 매개로 cytokine 자극에 따라 glycosaminoglycan이 조절됨을 보여 주어 생체실험의 결과를 지지해 준다고 여겨졌다. 이러한 결과는 치주인대 섬유모세포, 골세포간의 충격흡수 및 기계적 저항에 CH-4S가 관련된다고 여겨진다.

Ten Cate등⁵³⁾에 따르면 생리적 치아이동시 교원섬유가 용해되고 재형성되어 치주인대가 개조되는데 이때 섬유모세포가 중요한 역할을 한다고 하였고, 치주인대내 섬유모세포가 기계적 스트레스에 반응해 교원질을 합성하거나 파괴한다고 하였다. 치주인대세포에서 유전자 발현의 유형은 실험적 치아이동 동안에도 변화될 수 있으며 치주인대세포는 osteogenic potential을 가진 세포들의 지원을 받는다. 교정력에 반응하여 치주인대세포는 증식되거나 골모세포로 분화할 수 있기 때문에⁵⁴⁾ 본 연구에서 배양 치주인대세포에서의 GAG의 발현 변화가 있었다고 생각되며 향후 이러한 골개조 조절에 관계하는 분자 및 전기 정보에 대한 연구가 보완되어야 하리라고 생각한다.

V. 결 론

치아이동시 골대사에 있어 glycosaminoglycan의 역할에 대해 알아보고자 glycosaminoglycan의 주요 구성 성분인 chondroitin 4-sulfate(CH-4S)의 면역반응 정도 및 분포 양상을 백서 치아의 실험적 이동 과정에서 면역조직화학적으로 관찰하였다. 또한 치주인대세포를 배양하여 여러 종류의 cytokine을 투여한 후 CH-4S의 발현 양상의 변화를 western blot analysis를 통해 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치아이동에 반응하는 치수, 치주인대, 골모세포, 파골세포, 골세포 부위에서의 CH-4S 발현이 대조군보다 많았으나 상아질, 백악질에서의 CH-4S의 발현은 견인력 적용 기간에 관계없이 대조군과 큰 차이가 없었다.
2. 치수에서 CH-4S의 발현은 교정력을 가한 1일째에 크게 증가하였다가 7일째부터 감소되었으며 14일째에는 대조군과 차이가 없었다.
3. 치주인대에서 CH-4S의 발현은 주로 치조골 면을 따라 견인측에서 나타났는데 교정력을 가한 1일째에 가장 많은 발현을 보인 후 4일째부터 감소하기 시작하였다.
4. 골모세포와 파골세포 및 골세포에서 CH-4S의 발

현은 4일째에 가장 많은 발현을 보였고 7일째 이후에는 크게 감소하였다.

5. 치주인대세포에 PDGF-BB를 투여한 경우 3일째에 가장 많은 CH-4S의 발현을 보였다.
6. 치주인대세포에 TNF- α 처리 시 배양 1일째에 CH-4S의 발현 감소를 보였다.
7. 치주인대세포에 PDGF-BB와 TGF- β 를 혼합 투여한 경우가 PDGF-BB 및 TGF- β 를 단독 투여한 경우 보다 배양 3일째에 CH-4S의 발현이 많았고 LPS나 TNF- α 투여군은 유사한 발현 감소를 보였다.

이상과 같이 교정적 치아이동시 시기 및 부위에 따라 glycosaminoglycan의 발현이 차이를 보이며, 치주인대세포에서도 cytokine의 자극에 따라 glycosaminoglycan의 발현이 변화하는 것으로 보아, glycosaminoglycan이 골대사에 있어 중요한 조절 인자로서의 역할을 하는 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

1. Koumas H. Effects of pressure on the formation of collagen in the periodontal ligament. *Am J Orthod* 1969; 56: 604-12.
2. Macapanpan LC, Weinmann JP, Brodie AG. Early tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod* 1954; 24: 79-95.
3. Reitan K, Kvam E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod* 1971; 41: 1-14.
4. Kvam E. Scanning electron microscopy of tissue changes in the pressure surface of human premolar following tooth movement. *Scan J Dent Res* 1972; 80: 357-68.
5. Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ. Osteoarthritis diagnosis and management WB Saunders company, Philadelphia, 1984.
6. Silbert JE, Fitzpatrick TB, Eison AZ, Wolff K. Proteoglycans and glycosaminoglycans of skin. *Dermatology in general medicine* 4th ed. New York: McGraw-Hill 1993: 350-8.
7. Lindahl U, Hook M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Ann Rev Biochem* 1978; 47: 385-417.
8. Sadano Y, Mizoguchi I, Furusawa M. The process of calcification during development of rat tracheal cartilage characterized by distribution of alkaline phosphatase activity and immunolocalization of type I and II collagens and glycosaminoglycans of proteoglycan. *Anat Embryol* 1993; 188: 31-9.
9. David S, Monique LA role of secreted glycosaminoglycans in cell-substratum adhesion. *J Biol Chem* 1980; 255: 11564-9.
10. Davidovitch Z. Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. EBSCO Media Birmingham Alabama 1992.
11. Kirkham J, Robinson C, Smith AJ, Spence JA. The effect of periodontal disease of sulphated glycosaminoglycan distribution in the sheep periodontium. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 1031-7.
12. Okazaki, Kamada A, Gonda Y, Sasaki T. Analysis of chondroitin sulfate isomers in the periodontium of the monkey using high-performance liquid chromatography. *J Periodont Res* 1992; 27: 484-8.

13. Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J periodontol* 1990 : 61 : 103-11.
14. Gillard GC, Reilly HC, Bell-Booth PG, Flint MH. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Conn Tiss Res* 1979 : 7 : 37-46.
15. Waddington RJ, Embery G, Last KS. The glycosaminoglycan constituents of alveolar and basal bone of the rabbit. *Connect Tiss Res* 1988 : 17 : 171-80.
16. Dahllof G, Modeer T, Reinholt FP. Proteoglycans and glycosaminoglycans in phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Periodont Res* 1986 : 21 : 13-21.
17. Kagayama M, Sasano Y, Mizoguchi I, Kamo N, Takahashi I, Mitani H. Localization of glycosaminoglycans in periodontal ligament during physiologic and experimental tooth movement. *J Perio Res* 1996 : 31 : 229-34.
18. Shipley GD, Pittelkow MR, Wille JJJ, Scott RE, Moses HL. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res* 1986 : 46 : 2068-71.
19. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines : IL-6 and related molecules(IL-1 and TNF). *FASEB J* 1990 : 4 : 2860-7.
20. Armstrong CG, Mow VC. Variation in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration and water content. *J Bone and Joint Surg* 1982 : 64-A : 88.
21. Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M. *Molecular Biology of the cell* New York : Garland 1989 : 802-834.
22. Aakimoto S, Hayashi H, Ishikawa H. Disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycan in systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 1992 : 126 : 29-34.
23. Longas MO, Wisch P, Leibold MG, and Fleschmajer R. Glycosaminoglycans of skin and urine in pseudoxanthoma elasticum ; evidence for chondroitin 6-sulfate alteration. *Clinic Chim Acta* 1986 : 155 : 227-36.
24. Quentin E, Gladen A, Roden L, et al. A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan : Galactosyltransferase deficiency in fibroblast a pateint with progeroid syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 1990 : 87 : 1342-6.
25. Habuchi H, Kimata K, Suzuki S. Changes in proteoglycan composition during development of rat skin. *J Biol Chem* 1986 : 261 : 1031-40.
26. Castor CW. Connective tissue activationthe flux of connective tissue activating peptide during acute inflammation. *J Lab Clin Med* 1973 : 81 : 95-104.
27. Scott JE. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans in vitro and in the tissues. *FASEB J* 1992 : 6 : 2639-45.
28. Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec* 1980 : 196 : 191-200.
29. Vogel KG, Heinegard D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* 1985 : 260 : 9298-306.
30. Takagi M, Maeno M, Kagami A, Takahashi Y, Otuka K. Biochemical and immunocytochemical characterization of mineral binding proteoglycans in rat bone. *J Histochem Cytochem* 1991 : 39 : 41-50.
31. Parker SB, Butler WT, Hertzberg EL, Mintoff R. Expression of gap junctions in osteogenic tissue during mandibular development (abstract). *J Dent Res* 1992 : 71 : 683.
32. McMahon DG, Knapp AG, Dowling JE. Horizontal cell gap junctions : Single channel conductance and modulation by dopamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 : 86 : 7639-43.
33. Shapiro F. Corical bone repair : The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg* 1988 : 70 : 1067-79.
34. Wahl SM, Wong H, McCartney-Francis N. Role of growth factors in inflammation and repair. *J Cellular Biochem* 1989 : 40 : 193-9.
35. Cochran DL, Rouse CA, Lynch S, Graves DT. Platelet derived growth factor effects on calcium release from mouse calvaria. *J Dent Res* 1991 : 70 : 352.
36. Ross R. Platelet-derived growth factor. *Ann Rev Med* 1987 : 38 : 71-9.
37. Antoniadis HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Kiritsy CP, Lynch SE. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1991 : 88 : 56569.
38. Lynch SE, Colvin RB, Antoniadis HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 1989 : 84 : 640-6.
39. Lynch SE, deCastilla GR, Williams RC. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991 : 62 : 458-67.
40. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993 : 64 : 142-8.
41. Pfeilschifter J, Oechsner M, Gronwald R, Minne H, Ziegler R. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors : A comparison between insulin-like growth factor, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor B. *Endocrinol* 1990 : 127 : 69-75.
42. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG. Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1994 : 65 : 641-8.
43. Piche JE, Carnes DL, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 1989 : 68 : 761-7.
44. Piche JE, Graves DT. Study of the growth factor requirements of human bone derived cells : A comparison with human fibroblasts. *Bone* 1989 : 10 : 131-8.
45. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interleukin-1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *J Ortho Dentofac Orthop* 1991 : 99 : 226-40.
46. Kamagata Y, Miyasaka N, Inoue H, Hashimoto J, Iida M. Study of cytokine production in inflamed human gingival tissue in periodontitis. Interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Jpn J Periodontol* 1989 : 31 : 843-8.
47. Morrison DC, Cuncan JJ, Goodman SA. In vitro biological activities of endotoxin. In *Bacterial Endotoxin*, pp., Alan R. Liss, Inc 1985 : 81-98.
48. Morrison DC, Ulevitch R J. A Review-The interaction of bacterial endotoxins with cellular and humoral mediation system. *Am J Path* 1978 : 93 : 527-618.
49. Brandstrom H, Jonsson KB, Vidal O, Ljuhall S, Ohlsson C, Ljunggren O. TNF- α and beta upregulate the levels of osteoprogenitorin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 : 30 : 454-7.
50. Lader CD, Flanagan Am. Prostaglandin E2, Interleukin 1 α , and TNF- α increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 1998 : 139 : 3157-64.
51. Shao LE, Frigon NL, Yu A, Palyash J, Yu J. Contrasting effects of inflammatory cytokines and glucocorticoids on the production and TNF- α) and LPS modulates the Ca²⁺ signaling pathway in osteo-

blasts. *Am J Physiol* 1998 : 274C : 1686-98.

53. Ten Cate AR, Deporter DA, Freeman E. The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am J Orthod* 1976 : 69 : 155-68.

54. Nakagawa M, Kukita T, Nakasima A, Kurisu K. Expression of the type I collagen gene in rat periodontal ligament during tooth movement as revealed by in situ hybridization. *Arch Oral Biol* 1994 : 39 : 289-94.

- ABSTRACT -

A Study on the Expression of Glycosaminoglycans in the Experimental Tooth Movement of Rat and in Cultured Periodontal Ligament Cells

Kyung-Hwan Lee, Jong-Jin Lee, Kyung-hwa Kang, Eun-Cheol Kim, Sang-Cheol Kim

Department of Orthodontics and Oral Pathology, School of Dentistry, Wonkwang University

The purpose of this study was to evaluate 1) in vivo, the expression of chondroitin 4-sulfate (CH-4S), a structural element of glycosaminoglycans(GAGs), in periodontal tissue during the experimental movement of rat incisors, by labelled streptavidine biotin immunohistochemical staining for CH-4S, 2) In vitro, the expression of CH-4S in cultured human periodontal ligament(PDL) cells supplemented with 10ng/ml of TGF- β_1 , 20ng/ml of PDGF-BB, 1ng/ml TNF- α , or 1 μ g/ml LPS by western blot analysis.

The results of this study were as follows ;

1. The expression of CH-4S was stronger in pulp, PDL, osteoblasts, osteoclasts and osteocytes in experimental group than in control group, but was rare in dentin, and cementum of experimental groups, regardless of the duration of force application, which was not different from that of control group.
2. In experimental group, the expression of CH-4S in pulp began to increase at 1 day after force application and got to the highest degree at 7 days. After 14 days, the expression in CH-4S immunoreactivity was decreased, and became similar to that of control group at 28 days.
3. The expression of CH-4S in PDL was noted in adjacent to alveolar bone. PDL showed higher intensity of immunolabelling after 1 day of orthodontic tooth movement. And the expression was more stronger in the tension side than that of pressure side of PDL at 1 day, but more stronger in the pressure side than that of tension side of PDL at 4 days. After 7 days, a decrease in CH-4S expression was observed.
4. The expression of CH-4S in alveolar bone got to the highest degree at 4 days, and At 7 days, a decrease in CH-4S expression was observed.
5. PDGF-BB notably raised the expression of CH-4S in the PDL cells at 3 days of cultivation
6. The expression of CH-4S of PDL cells was decreased with the application of TNF- α at 1 day.
7. Admixture of TGF- β_1 and PDGF-BB got more expression of CH-4S in PDL as compared to only TGF- β_1 or PDGF-BB. A similar decrease of the expression of CH-4S was observed in the case of application of LPS or TNF- α .

KOREA. J. ORTHOD. 2001 : 31(4) : 447-58

※ **Key words** : Tooth movement, Periodontal ligament cell, Bone metabolism, Glycosaminoglycans, Chondroitin 4-sulfate