

# PDGF-BB에 의한 치주인대세포활성에 대한 TGF- $\beta$ 의 효과

백상철 · 박진우 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

궁극적인 치주치료의 목적은 염증성의 치주질환의 진행으로 잃어버린 치주지지조직을 재생시키는데 있다고 볼 수 있다. 이러한 목적을 이루기 위해 치주조직이 신생조직으로 재형성되려면 치주조직 중 치주인대세포에서 유래된 세포들이 창상이나 괴사로 인해 발생한 결손부로 이주하는 것이 치유과정에 중요한 역할을 할 것이라고<sup>1)</sup> 알려져 있으며, 치주인대 내에 있는 미분화된 전구세포들이 노출된 치근면에 이주 부착 증식하여 잘 조화된 치주조직의 부착기구를 형성하여야 하고 이와 더불어 골의 전구세포가 이주 증식하여 재생된 치주인대와 함께 성숙되어야한다<sup>2,7)</sup>.

치주인대는 섬유아세포, 조골세포, 백악아세포, 파골세포, 미분화된 중배엽세포들의 결합조직과 세포외기질로 이루어져 있는데 세포외기질은 교원질, 비교원성 단백질, 단백당으로 구성된다. 이중 교원질이 주된 구성 성분으로서 치주인대에서는 총 단백질의 47-52%를 차지하고 있다<sup>8,9)</sup>.

최근의 연구에서는 세포와 그들의 세포외기질 사이의 특수한 상호작용이 성장과 형태, 그리고 기능에 있어서 중요하다고 제시된 바 있다<sup>10)</sup>. 이들 세포외기질의 분자들은 조직들을 결합시키는데 세포에 중요

한 영향을 주고 서로 다른 세포와 조직의 작용을 조절할 수 있다. 치주조직의 창상의 치유는 구조적으로나 기능적으로 손상된 조직에 세포적 또는 분자적인 일련의 사건들의 유기적 과정의 결과인데, 손상의 치유는 조직결손이 일어나면서 바로 시작되며 이때 손상 받은 세포와 염증세포로부터 폴리펩타이드계 성장인자(Polypeptide Growth Factor, 이하 PGF로 표기)의 분비가 이러한 과정에서 매우 중요한 부분을 차지한다<sup>11)</sup>고 알려져 있다. 이는 Terranova와 Wikesjö<sup>12)</sup>가 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외기질의 특이한 상호작용과 PGF에 의해 조절되며 PGF가 치주조직 재생에 중요한 역할을 한다고 시사한 바에서도 알 수 있다. PGF는 구조와 기능에서 호르몬과 유사하지만 합성되는 장소나 특이표적세포에 이동하는 방법이 더 다양한 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>.

이들 PGF중 치주치료의 재생을 조절하는 성장인자로서 최근에 혈소판유래성장인자(Platelet-Derived Growth Factor, 이하 PDGF로 표기)와 변형성장인자- $\beta$ (Transforming Growth Factor- $\beta$ , 이하 TGF- $\beta$ 로 표기)가 많이 연구되어 지고 있다. PDGF는 1974년 발견되어 중배엽의 세포 즉 섬유아세포, 신경세포, 평활근세포, 골세포의 성장과 증식을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며<sup>14-17)</sup> 9.8의 등전점

과 30KDa의 분자량을 가지고 있는 조절성 단백질로서<sup>18-21)</sup> 단중이량체(PDGF-AA, BB)와 이중이량체(PDGF-AB)로 존재함이 발견되었으며 세포막에는  $\alpha$   $\beta$ 형 두 가지 형태의 PDGF 수용기가 있는 것<sup>22)</sup>으로 알려져 있다. 이러한 PDGF의 유리되는 근원은 혈소판의  $\alpha$ -과립으로 보고된 바 있으며<sup>23)</sup> 혈소판 이외에 단핵세포 및 대식세포<sup>24)</sup>, 섬유아세포<sup>25)</sup>, 내피세포<sup>26)</sup>, 골기질<sup>27)</sup>등으로부터 분리된다고 밝혀졌고 중성구, 단핵세포 그리고 섬유아세포에 대해 화학주성이 있으며<sup>28,29)</sup>, 이러한 PDGF는 fibronectin, 교원질분해효소 그리고 다른 성장인자들의 합성을 포함하는 창상치유과정에 있어서 주된 역할을 하는 이들 세포들을 자극시킨다고 알려져 있다<sup>30-33)</sup>.

Ross 등<sup>34)</sup>과 Kohler와 Lipton<sup>35)</sup>은 1974년 각각 혈소판으로부터 동맥의 평활근세포의 증식을 자극하는 PDGF를 발견하였고, 이후 Piché와 Graves<sup>36)</sup>는 골유래 세포 배양시 PDGF를 투여한 경우 세포의 증식이 촉진되었다고 보고하였으며, Rutherford 등<sup>37)</sup>은 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF의 효과를 규명한 실험에서 각 세포의 증식에 유효하다고 보고하였다. 최근에는 장과이<sup>38)</sup>가 동물실험에서 PDGF 단독투여시 잘 분화된 백악아세포에 의해 형성된 신생백악질에 결합조직이 수직으로 배열되었음을 보고하였고, 조<sup>39)</sup> 등은 개에서 실험적으로 야기된 치근이개부병변에 PDGF 단독투여시 전체적으로 조직재생의 속도가 빠르고 치유양상도 치주조직 고유형태로 변화 진행됨이 관찰되었다고 보고하였다.

TGF- $\beta$ 는 혈소판과 대식세포에서 분리되고 골조직에 많이 축적되어 있으며 골조직과 결합조직에서 세포의 증식과 기질합성능을 촉진하여 조직손상의 치유에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며<sup>40-44)</sup>, 치주상처부위에 있어서도 세포증식의 다기능조절자로서 다른 세포들의 증식을 촉진시키거나 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다<sup>45)</sup>. 이러한 TGF- $\beta$ 는 Normal Rat Kidney(이하 NRK로 표기)의 섬유아세포에서 형질전환을 일으키는 원인인자로 발견되었으며<sup>46)</sup>, 섬유아세포에 대한 화학주성의 능력이 있고 세포외기질 단백질의 합성을 유도하

고 세포외기질의 protease-induced degradation을 조절하며 다른 성장인자의 합성을 자극하는 것으로 알려져 있고<sup>47, 48)</sup>  $\alpha$ 와  $\beta$ 로 구분되는데 TGF- $\alpha$ 는 50개의 아미노산으로 구성된 단일체 단백질로서 5.6KDa의 분자량을 가지며, 상피성장인자와 42%의 동질성을 가짐으로써 상피성장인자의 수용체와 경쟁적으로 결합하여 이와 유사한 생물학적 활성을 보이는 것으로 알려져 있으며<sup>49-51)</sup>, TGF- $\beta$ 는 25KDa의 분자량을 가지고 이황화결합으로 연결된 2개의 아미노산 사슬로 이루어져 있다<sup>52, 53)</sup>.

창상부위에서 여러 가지 성장인자들이 분비되어 상호작용하여 치유과정에서 조절체계능력을 제공하는데, 이와 같이 TGF- $\beta$ 와 PDGF가 증배엽세포의 증식을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>54)</sup>. PDGF와 TGF- $\beta$ 의 결합조직 치유과정에서의 각각의 역할과 중요성이 활발히 연구되어 오면서 이들의 상호작용에 대해서도 많은 연구가 이루어져, TGF- $\beta$ 는 여러 형태의 증배엽세포에서 PDGF에 대한 증식반응을 변화시키는 능력을 가지고 있다는 것이 보고된 바 있고<sup>55)</sup>, TGF- $\beta$ 와 PDGF는 각각 NRK 섬유아세포의 증식을 촉진시키지만, 동시에 투여시 섬유아세포 증식을 억제시킨다고 보고하였다<sup>56)</sup>. 그러나 사람의 피부조직의 섬유아세포를 PDGF 투여 전에 TGF- $\beta$ 에 노출시키면 증식을 촉진시켰다는 연구가 있다<sup>57)</sup>.

Mustoe 등<sup>58)</sup>은 쥐의 실험에서 TGF- $\beta$ 와 PDGF가 전충절개창상의 치유를 촉진하는 것을 밝혀 냄으로써 성장인자가 창상치유에 영향을 미친다는 것을 보여 주었다. Pierce 등<sup>59)</sup>은 TGF- $\beta$ 와 PDGF를 병용투여한 생체실험에서 결합조직의 기질밀도와 기질단백합성을 증가시키고 창상부위로 대식세포와 섬유아세포의 이주를 증가시켰다고 보고하였다. 또 Piché 등<sup>60)</sup>은 TGF- $\beta$ 는 치은섬유아세포 증식에 대해 미약한 효과를 나타내나 PDGF는 치은섬유아세포와 치주인대세포의 증식을 증가시킨다고 보고하였고, Oates 등<sup>55)</sup>은 사람의 치주인대세포에 PDGF 투여시 PDGF의 3가지 동종체(isoform) 모두 치주인대세포의 증식을 조절하는데 주된 역할을 한다고 주장하였으며 TGF- $\beta$ 는 치주인대세포에 대해 비교적 미약한 증식인자로 작용하나 TGF- $\beta$ 전 배양처리후 PDGF투

여시 세포증식이 PDGF 단독투여시보다 증가된 양상을 나타낸다고 보고함으로써 TGF- $\beta$ 가 PDGF에 대한 세포반응을 조절함을 시사하였다. Dennison 등<sup>54)</sup>은 TGF- $\beta$ 과 PDGF 병용투여, TGF- $\beta$ 을 단독투여시 치주인대세포의 증식을 증가시키고, PDGF 단독투여시 치은섬유아세포의 증식을 촉진시켰으며, PDGF에 대한 치주인대세포의 증식반응은 TGF- $\beta$ <sub>1</sub>에 의해 촉진된다고 보고하였다.

이상의 연구 결과들을 살펴본 결과 중배엽세포의 조절인자로서 TGF- $\beta$ 와 PDGF가 치주인대세포의 이주와 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 이들 두 성장인자를 선택하여 배양된 치주인대세포에 병용투여하여 세포의 증식능, 단백질 및 교원질 합성능을 측정해 봄으로써 TGF- $\beta$ 가 치주인대세포의 증식과 활성화에 대한 PDGF의 효과를 상승시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료(시약)

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 DMEM로 표기)을 사용하였고, fetal bovine serum (Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그 외 trypsin, bovine serum albumin (이하 BSA로 표기), ascorbic acid, dimethyl sulfoxide, highly purified bacterial collagenase type VII, sodium paranitrophenyl-2-phosphate, paranitrophenol, nonident F-40 (이상 Sigma사, 미국)등을 사용하였다. 그리고 [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine(6.7 Ci/mmol)(New England Nuclear사, 미국), L-[5-<sup>3</sup>H] proline (12.4 Ci/mmol)(New England Nuclear사, 미국), 유전자 재조합형 PDGF-BB, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>(Genzyme사, 미국)을 사용하였다.

### 2. 치주인대세포의 세포배양

교정치료를 목적으로 경북대학교병원에 내원한 환자의 발거될 제일소구치를 해당부위로 하고 초기배

양과정에서 야기될 수 있는 세균감염을 예방하고자 통상의 배양액에 포함되는 항생제 용량의 2배인 200U/ml penicillin (근화제약, 한국)과 200  $\mu$ g/ml streptomycin (동아제약, 한국)이 첨가된 DMEM을 생검배지로 준비하였다. 조직처리과정에서 치은조직합입을 배제하고 치주인대조직만 채취하기 위하여 제일 소구치부위에 내사면 절개를 가하고 치경부 1/3 부위를 소파한 후 제일소구치를 발거하여 생검배지에 침수시켰다. 발거한 치이를 생검배지로 3회 세척한 후 치근중간 1/3부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절한 다음 35mm 배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고 37°C, 100%습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 치주인대세포가 조직세면으로부터 증식되어 단층밀생이 형성된 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였다. 이 실험에서 모든 세포들은 4세대에서 6세대 사이의 세포를 사용하였다.

### 3. 치주인대세포 증식 및 DNA합성 측정

#### 1) TGF- $\beta$ 과 PDGF-BB 동시투여군

TGF- $\beta$ 과 PDGF-BB가 치주인대세포 증식능에 미치는 영향은 [<sup>3</sup>H]thymidine이 DNA 내로 편재되는 속도로써 관찰하였다. 치주인대세포를 1x10<sup>5</sup> cells/ml 이 되게 24-well culture plates(Coming사, 미국)에 넣고 3일간 배양하여 육안적인 밀생상태가 되게 하였다. 그 후 세포배양액을 제거한 세포층을 phosphate buffered saline(이하 PBS로 표기)으로 2번 씻은 후 0.4% FBS이 든 DMEM으로 교체하여 24시간 동안 세포주기를 정지시킨 후 0.1% FBS와 1  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]thymidine가 함유된 DMEM에 1 혹은 10ng/ml PDGF-BB, 1ng/ml PDGF-BB와 1ng/ml TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, 1ng/ml PDGF-BB와 5ng/ml TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, 10ng/ml PDGF-BB와 1ng/ml TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, 10ng/ml PDGF-BB와 5ng/ml TGF- $\beta$ <sub>1</sub>을 투여한 군을 실험군으로하고 TGF- $\beta$ 과 PDGF-BB를 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 24시간동안 배양하였다.

세포배양액을 제거하고 세포층을 PBS로 씻은 후 5% trichloroacetic acid(이하 TCA로 표기)를 1ml 넣고 4°C에서 20분간 방치하였다. 그후 5% TCA로 2회 세척하고 찬 ethanol 1ml를 넣어 씻고 실온에서 건조시켰다. DNA내로 편입되지 않은 방사능을 씻어 내고, 준비된 세포층에 500 μl의 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>가 든 0.1N NaOH를 넣어 세포를 완전히 녹인 후 5ml scintillation cocktail과 섞어 DNA로 편입된 방사능을 β-counter로 측정하였다. 측정된 값은 CPM(counter per minute)으로 표기하였다.

## 2) TGF-β<sub>1</sub> 전처리 배양군

TGF-β<sub>1</sub> 전처리 배양군에서는 세포 주기를 24시간 동안 정지시킨 다음 TGF-β<sub>1</sub>을 투여하고 4 및 24시간 배양후 PBS로 두번 세척하고 1 μCi/ml [<sup>3</sup>H]thymidine, 0.1% FBS, PDGF-BB가 든 DMEM으로 교체하고 24시간 동안 배양한 다음 위와 동일한 방법으로 DNA합성능을 측정하였다.

## 4. 총단백질과 교원질 합성능의 측정

### 1) TGF-β<sub>1</sub>과 PDGF-BB 동시투여군

치주인대세포를 각각 24-well culture plates (Corning사, 미국)에 한 well당 1×10<sup>5</sup>세포를 접종한 후 10% FBS가 함유된 1ml DMEM에서 밀생상태가 될 때까지 3일간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 50 μg/ml ascorbic acid와 0.1% FBS이 첨가된 DMEM으로 교환하고 1 및 10ng/ml PDGF-BB, 1ng/ml PDGF-BB와 1ng/ml TGF-β<sub>1</sub>, 1ng/ml PDGF-BB와 5ng/ml TGF-β<sub>1</sub>, 10ng/ml PDGF-BB와 1ng/ml TGF-β<sub>1</sub>, 10ng/ml PDGF-BB와 5ng/ml TGF-β<sub>1</sub>을 투여한 후 2 μCi [<sup>3</sup>H]proline을 첨가하여 24시간이 경과한 후 생성된 총단백질과 교원질 양을 Peterkofsky 와 Diegelmann<sup>(61)</sup> 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. PDGF-BB, TGF-β<sub>1</sub>을 투여한 군을

실험군으로하고 PDGF-BB, TGF-β<sub>1</sub>을 투여하지 않은 군을 대조군으로 하였다.

각 well에 5x collagenase buffer(0.25M Tris, 0.025M CaCl<sub>2</sub>와 0.0125M N-ethylmaleimide 함유, pH 7.4)를 250 μl 첨가하고 24-well culture plates를 얼음 위에 놓고 30초간 초음파 분쇄기로 세포막을 파괴시킨 후 1ml씩 취하여 microfuge tube에 넣고 50% TCA/5mM proline 300 μl를 첨가한 후 잘 혼합하여 0°C에서 5분간 방치한 후 1000×g에서 5분간 원침하여 상층액을 버리고 5% TCA/1mM proline으로 3회 세척한 후 침전물을 0.2N NaOH에 용해시킨 후 1M HEPES buffer(pH 7.2)를 첨가하여 중화시킨 후 5x collagenase buffer 100 μl를 첨가하였다.

Microfuge tube에 각 용액을 반으로 나누어 넣은 후 교원질 합성량을 측정하기 위한 microfuge tube에 15U collagenase가 함유된 collagenase buffer를 15 μl 주입하고 총단백질 합성량을 측정하기 위한 microfuge tube에는 15U collagenase가 함유되지 않는 collagenase buffer를 15 μl 주입하여 37°C에서 90분간 배양한 다음 collagenase활성을 정지시키기 위해 0°C로 냉각시키고 각 tube에 50% TCA/2.5% tartaric acid를 첨가하여 4°C에서 30분간 방치하였다.

교원질 합성량을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유된 microfuge tube를 1000×g에서 5분간 원침 후 상층액과 5% TCA/1mM proline으로 세척한 세척액을 counting vial에 담아 10ml scintillation cocktail을 넣어 liquid scintillation counter (Packard 사, 미국)로 5분간 방사능을 측정하였다.

총단백질량을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유되지 않은 microfuge tube를 1000×g에서 5분간 원침 후 상층액을 버리고 5% TCA/1mM proline으로 세척 후 침전물을 0.2N NaOH용액으로 용해시켜 counting vial에 담아 상기의 방법으로 방사능을 측정하였다. 단백질 합성에 대한 교원질합성의 상대적 비율은 다음의 공식에 의거하여 계산하였다<sup>(62)</sup>.

$$\text{percent of collagen} = \frac{\text{dpm in collagen} \times 100}{(\text{dpm in noncollagenous protein}) \times 5.4 + \text{dpm in collagen}}$$

\* dpm : disintegration per minute

비교원성 단백질량은 총단백질량에서 교원질량을 공제하므로써 산출하였다.

2) TGF- $\beta_1$  4 및 24시간 전처리 배양군

TGF- $\beta_1$  전처리 배양군에서는 세포가 밀생상태에 도달한 3일 후 1, 5ng/ml TGF- $\beta_1$ 을 주입하고 4 및 24 시간 배양후 PBS로 두번 세척하고 1, 10ng/ml PDGF-BB, 2  $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H]-proline, 0.1% FBS가 든 DMEM으로 교체하고 24시간 동안 배양한 다음 위와 동일한 방법으로 총단백질과 교원질합성능을 측정하였다.

### III. 성적

#### 1. 치주인대세포의 DNA 합성능에 대한 효과

1) TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB 동시투여군의 DNA합성능

치주인대세포에 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB을 동시투여 하였을 때 DNA 합성능의 효과는 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-

BB 투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 증가 양상이 높았고 PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  병용투여군에서 DNA 합성능이 증가된 양상을 나타내었으며 5ng/ml TGF- $\beta_1$ 과 10ng/ml PDGF-BB투여군에서보다 높은 증가 양상을 보였다. 5ng/ml TGF- $\beta_1$ 을 투여함으로써 PDGF-BB 단독투여군에 비해 1ng/ml PDGF-BB 동시투여군에서는 약 1.6배, 10ng/ml PDGF-BB 동시투여군에서는 약 1.3배 정도 DNA 합성능이 증가된 양상을 보였다(Table 1).

2) TGF- $\beta_1$  4 시간 및 24시간 전처리 배양군의 DNA 합성능

TGF- $\beta_1$  4시간과 24시간 전처리 배양군 양군 공히 1ng/ml PDGF-BB 투여군을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 증가 양상이 더 높았고 PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  전처리군에서 DNA 합성능이 증가된 양상을 나타내었으며 5ng/ml TGF- $\beta_1$  전처리 후 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서보다 높은 증가 양상을 보였

Table 1. The combination effect of TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB and the effect of TGF- $\beta_1$  preincubation for 4 or 24 hours on DNA synthetic activity in human periodontal ligament cells(cpm x 10<sup>-3</sup> /well).

PDGF-BB(ng/ml)		TGF- $\beta_1$ (ng/ml)		
		0	1	5
Com,	0	4.9±0.6		
	1	7.6±0.2	7.7±1.9**	12.4±1.9*
	10	18.0±0.1**	22.3±2.4**	25.4±1.4**
4Hrs	0	4.1±1.1		
	1	3.1±0.7	6.1±0.4*	10.9±2.1*
	10	6.8±1.6	19.1±1.4**	27.6±3.8**
24Hrs	0	7.0±1.2		
	1	6.3±1.4**	19.0±0.9**	24.1±1.2*
	10	19.8±1.9*	39.3±2.5**	42.2±4.2**

Twenty-four well culture plates were seeded with 1x10<sup>5</sup> cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After incubation for 3 days, the medium was replaced with Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 0.4% fetal bovine serum incubated for 24 hours. TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB were added to the quiescent cells, and the quiescent cells were treated with TGF- $\beta_1$  at 1ng/ml or 5ng/ml concentration for 4 hours or 24 hours prior to a incubation with PDGF-BB, one  $\mu$ Ci [ $^3$ H] thymidine were labeled for the last 24h of culture. The values are expressed as mean and S.D. of three determination.

\* : Significantly different from control value (P < 0.05)

\*\* : Significantly different from control value (P < 0.01)

다. 5ng/ml TGF- $\beta_1$ 을 4시간 전처리함으로서 PDGF-BB 단독투여군에 비해 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 약 3.5배, 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 약 4배 정도 DNA 합성능이 증가된 양상을 보였으며, 5ng/ml TGF- $\beta_1$ 을 24시간 전처리함으로서 PDGF-BB 단독투여군에 비해 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 약 3.8배, 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 약 2배 정도 DNA 합성능이 증가된 양상을 보였다(Table 1, Figure 1, 2).

## 2. 치주인대세포의 총단백질 합성량에 대한 효과

### 1) TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB 동시투여군의 총단백질 합성량

치주인대세포에 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB을 동시투여 하였을 때 총단백질 합성량의 효과는 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 증가 양상이 더 높게 나타났다. PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  동시투여군에서 총단백질 합성량이 증가된 양상을 나타내었으며, 대조군에 비해 1ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 TGF- $\beta_1$  투여시 총단백질의 합성량의 증가량이 미약하였으나 10ng/ml PDGF-

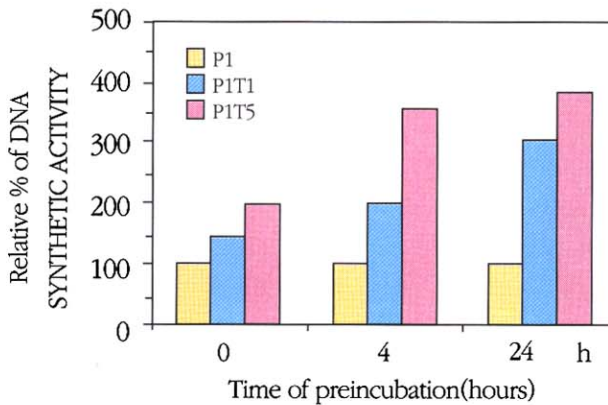


Figure 1. The effects of TGF- $\beta_1$  preincubation on DNA synthetic activity in cells stimulated with 1 ng/ml PDGF-BB. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDGF, T1 : 1ng/ml TGF- $\beta_1$ , T5 : 5ng/ml TGF- $\beta_1$ .

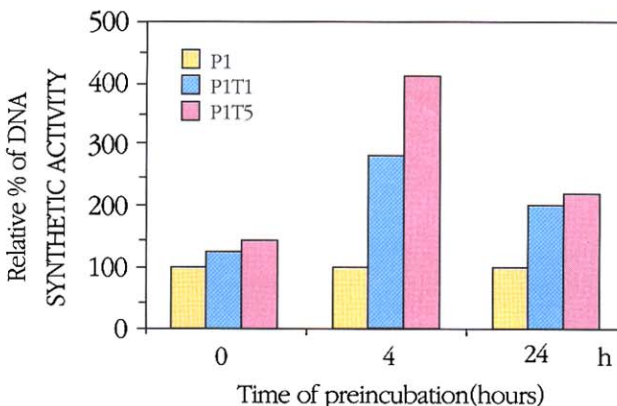


Figure 2. The effects of TGF- $\beta_1$  preincubation on DNA synthetic activity in cells stimulated with 10 ng/ml PDGF-BB. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDGF, T1 : 1ng/ml TGF- $\beta_1$ , T5 : 5ng/ml TGF- $\beta_1$ .

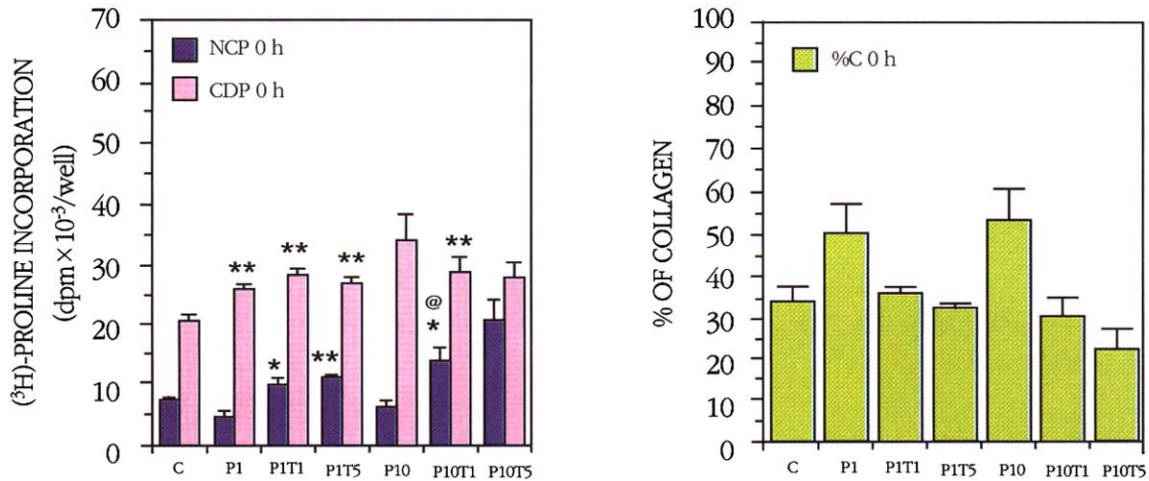
**Table 2.** The combination effect of TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB and the effect of TGF- $\beta_1$  preincubation for 4 or 24 hours on total protein synthesis in human periodontal ligament cells(dpm  $\times 10^{-3}$  /well).

PDGF-BB(ng/ml)		TGF- $\beta_1$ (ng/ml)		
		0	1	5
com.	1	30.4 $\pm$ 0.7	36.8 $\pm$ 1.9*	36.5 $\pm$ 1.7**
	10	39.4 $\pm$ 3.5	42.4 $\pm$ 1.0**	46.8 $\pm$ 2.3*
	0	17.8 $\pm$ 2.0		
4Hrs	1	24.7 $\pm$ 3.7	25.7 $\pm$ 1.7**	32.5 $\pm$ 4.9*
	10	31.2 $\pm$ 3.2**	31.9 $\pm$ 1.9*	44.1 $\pm$ 0.8**
	0	18.3 $\pm$ 4.4		
24Hrs	1	20.6 $\pm$ 2.0	37.9 $\pm$ 5.2**	45.7 $\pm$ 1.2**
	10	26.3 $\pm$ 2.1*	44.2 $\pm$ 0.9**	67.4 $\pm$ 4.9**
	0			

Twenty four-well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbecco's modified Eagle medium containing 0.4% fetal bovine serum,  $50 \mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and  $2 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] proline and the indicated amounts of TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB combined incubation was added, and the quiescent cells were treated with TGF- $\beta_1$  at 1ng/ml or 5ng/ml concentration for 4 hours or 24 hours prior to a incubation with PDGF-BB. Total protein synthesis were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinations.

\*: Significantly different from control value ( $P < 0.05$ )

\*\* : Significantly different from control value ( $P < 0.01$ )



**Figure 3.** The effect of TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB in combination on collagenous, noncollagenous protein synthesis, and percent of collagen in human periodontal ligament cells. Twenty four-well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, Dulbecco's modified Eagle medium containing 0.1% fetal bovine serum,  $50 \mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and  $2 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] proline and the indicated amounts of TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB combined incubation was added. Collagenous, noncollagenous protein synthesis, and percent of collagen were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinations. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDGF, T1 : 1ng/ml TGF- $\beta_1$ , T5 : 5ng/ml TGF- $\beta_1$ .

\*: significantly different from control value ( $p < 0.05$ )

\*\* : significantly different from control value ( $p < 0.01$ ), @ : significantly different from P10 group ( $p < 0.05$ )



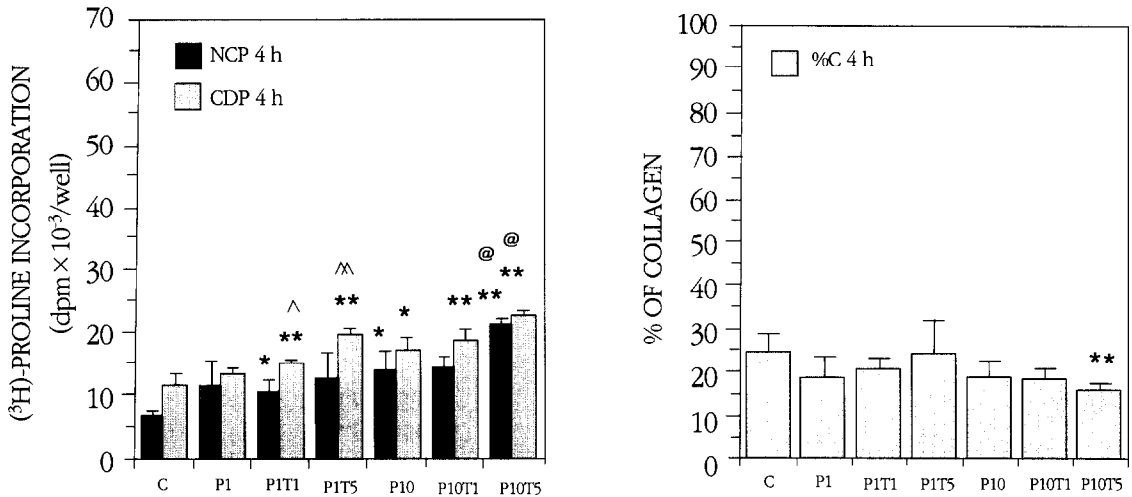


Figure 4. The effect of TGF- $\beta_1$  preincubation for 4 hours on collagenous, noncollagenous protein synthesis, and percent of collagen in human periodontal ligament cells stimulated with 1, 10ng/ml PDGF-BB. Twenty four well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, The quiescent cells were treated with TGF- $\beta$  at 1ng/ml or 5ng/ml concentration for 4 hours or 24 hours prior to a incubation with PDGF-BB. Dulbecco's modified Eagle medium containing 0.1% fetal bovine serum, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid and 2  $\mu$ Ci[ $^3$ H] proline was added. Collagenous, noncollagenous protein synthesis, and percent of collagen were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinations. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDGF, T1 : 1ng/ml TGF- $\beta_1$ , T5 : 5ng/ml TGF- $\beta_1$ .

\* : significantly different from control value (  $p < 0.05$  ), \*\* : significantly different from control value (  $p < 0.01$  )

· : significantly different from P1 group (  $p < 0.05$  ), ·· : significantly different from P1 group (  $p < 0.01$  )

@ : significantly different from P10 group (  $p < 0.05$  )

BB 투여군에서는 모든군에서 TGF- $\beta_1$ 의 농도 의존적으로 대조군에 비해 총단백질 합성량이 증가된 양상을 보였다(Table 2).

#### 2) TGF- $\beta_1$ 4 및 24시간 전처리 배양군의 총단백질 합성량

대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 증가 양상이 더 높았고 TGF- $\beta_1$  전처리 배양군이 PDGF-BB 단독투여군보다 총단백질 합성량이 증가된 양상을 나타내었다. 또한 TGF- $\beta_1$  24 시간 전처리 배양군이 TGF- $\beta_1$  4시간 전처리 배양군에 비해 총단백질 합성량의 정도가 더 높게 나타났다(Table 2).

### 3. 치주인대세포의 교원질과 비교원성 단백질 합성에 대한 효과

#### 1) TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB 동시투여군의 교원질과 비교원성 단백질 합성능

대조군에 비해 모든 군에서 교원질합성능이 증가하는 경향을 나타내었으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군보다 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 더 높게 나타났으나 10ng/ml PDGF-BB군에서 PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  동시투여군에서 TGF- $\beta_1$ 의 농도가 증가함에 따라 교원질합성능이 감소하는 경향을 보였다. 비교원성단백질의 합성능은 1, 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군을 제외하고 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다. 총단백질에 대한 교원질 합



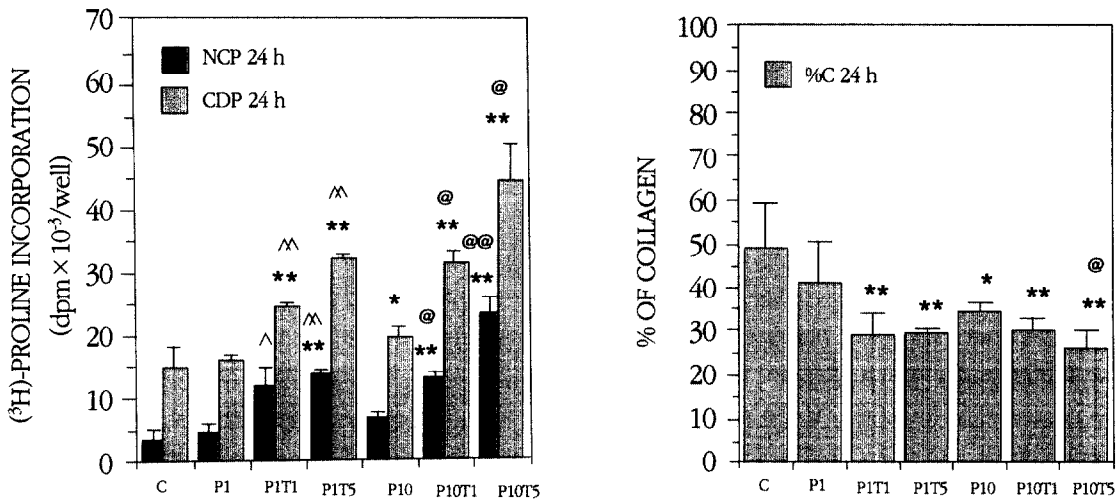


Figure 5. The effect of TGF- $\beta_1$  preincubation for 24 hours on collagenous, noncollagenous protein synthesis, and percent of collagen in human periodontal ligament cells stimulated with 1, 10ng/ml PDGF-BB. Twenty four-well culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  cells per well in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum. After 3 days, The quiescent cells were treated with TGF- $\beta_1$  1 at 1ng/ml or 5ng/ml concentration for 4 hours or 24 hours prior to a incubation with PDGF-BB. Dulbecco's modified Eagle medium containing 0.1% fetal bovine serum, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid and 2  $\mu$ Ci[ $^3$ H] proline was added. Collagenous, noncollagenous protein synthesis, and percent of collagen were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinations. P1 : 1ng/ml PDGF, P10 : 10ng/ml PDGF, T1 : 1ng/ml TGF- $\beta_1$ , T5 : 5ng/ml TGF- $\beta_1$ .

\* : significantly different from control value (  $p < 0.05$  ), \*\* : significantly different from control value (  $p < 0.01$  )

· : significantly different from P1 group (  $p < 0.05$  ), ·· : significantly different from P1 group (  $p < 0.01$  )

@ : significantly different from P1 group (  $p < 0.05$  ), @@ : significantly different from P10 group (  $p < 0.01$  )

성의 상대적 비율은 PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  동시투여군에서 감소하는 경향을 나타내었다 (Figure 3).

## 2) TGF- $\beta_1$ 4 및 24시간 전처리 배양군의 교원질과 비교원성 단백질 합성능

대조군에 비해 모든 군에서 교원질과 비교원성 단백질 합성능이 증가하는 경향을 나타내었으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군보다 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서는 더 높게 나타났고 PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  동시투여군에서 총단백질 합성량이 증가된 양상을 나타내었으며 그 정도는 TGF- $\beta_1$ 의 농도 의존적인 양상을 보였다. 총단백질에 대한 교원질 합성의 상대적 비율은 TGF- $\beta_1$  4 및 24시간 전처리 배양군 모두에서 대조군에 비해 감소하는 경향을

나타내었다(Figure 4, 5).

## IV. 고찰

PDGF는 30KDa의 분자량을 가지는 조절성 단백질로서 단종이량체와 이중이량체로 존재하며 세포막에는 두 가지 형태의 PDGF 수용기가 있으며,  $\alpha$ 형 수용기는 PDGF-AA, AB 그리고 BB에 대해 높은 친화력으로 결합하는 반면  $\beta$ 형 수용기는 PDGF-BB에 높은 친화력이 있고 PDGF-AB에는 친화력이 낮으며 PDGF-AA는 결합하지 않는다<sup>22)</sup>고 알려져 있다. Nister 등<sup>66)</sup>과 Kazlanskus 등<sup>67)</sup>은 PDGF-BB, AB는 동등한 활성도를 가지고 있으며 사람의 섬유아세포에서 DNA 합성을 자극하는 동일한 강도를 가지고 있으나 PDGF-AA는 세포유사분열에 대한 활성도가 다

른 두 개의 isoform과 비교시 약하게 나타난다고 보고하였다. Ramakrishnan과 Cho<sup>68)</sup>는 쥐의 치주인대 세포에 대한 PDGF의 수용기에 관한 실험에서 쥐의 치주인대세포에는 세포의 화학주성과 증식에 중요한 역할을 하는  $\beta$ 형태의 PDGF의 수용기가 존재함을 보고하였고, Matsuda 등<sup>69)</sup>은 PDGF-BB가 PDGF-AB보다 낮은 농도에서 세포증식능과 화학주성의 효과에 더 큰 영향을 나타내었다고 하였으며, Oates 등<sup>55)</sup>은 사람의 치주인대세포에 PDGF-AA, BB를 투여해서 세포의 증식을 알아본 실험에서 PDGF-AA, BB 모두 DNA 합성을 증가시킴을 보임으로써 사람의 치주인대세포에는  $\alpha$ 와  $\beta$ 의 수용기가 존재할 것이라고 보고하였다. 이러한 관찰은 치주인대 섬유아세포가 PDGF의  $\beta$ 형 수용기를 많이 가졌다는 것을 시사한다고 볼 수 있다. 그리고 TGF는 다양한 세포의 분화와 재생에 관여하고 있으며 현재 TGF- $\alpha$ 는 50개의 아미노산으로 구성된 단일쇄단백질로서 분자량이 작고 상피성장인자와 42%의 동질성을 가짐으로써 상피성장인자의 수용체와 경쟁적으로 결합하여 이와 유사한 생물학적 활성을 보이는 것으로 알려져 있다<sup>49-51)</sup>. TGF- $\beta$ 는 25KDa의 분자량을 가지며 이황화결합으로 연결된 2개의 아미노산 사슬로 이루어지며 TGF- $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 가 발견되었는데  $\beta_1$ 과  $\beta_2$ 의 차이는 98KDa 지역에 특정한 띠로 갖고 있는 것으로 나타났다<sup>63, 66)</sup> 사람에게 있어서는 아직 명확하지 않으나 혈소판에서 TGF- $\beta_1$ 이 추출된다고 알려져 있다<sup>55)</sup>. 그러므로 이상의 연구들을 근거로 하여 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB를 본 실험의 연구재료로 사용하였다.

TGF- $\beta_1$ 이 PDGF의 효과를 조절할 수 있는지를 알아보기 위하여 Oates 등<sup>55)</sup>이 TGF- $\beta_1$ 을 투여하여 1시간 전처리 한 배양군에서는 세포증식능이 대조군과 큰 차이가 없으나 8, 16, 24시간 전처리 한 배양군에서는 세포증식능이 증가하였음을 보고한 연구를 근거로 하여 두 성장인자의 투여시기에 따라 미치는 영향이 다를 것으로 사료되어 본 연구에서는 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB의 동시투여와 TGF- $\beta_1$ 의 4 및 24시간 전처리 배양군으로 나누어서 실험하였다.

각 성장인자의 농도 설정에 있어서는 TGF- $\beta_1$ 은 조 등<sup>70)</sup>과 김 등<sup>71)</sup>의 논문에서 0, 0.5, 1, 2.5, 5,

10ng/ml 투여시 5ng/ml까지 세포증식과 총단백질 합성량이 증가하였으나 10ng/ml에서는 감소하는 경향을 보이는 연구를 바탕으로 본 실험에서는 0, 1, 5ng/ml의 농도를 사용하였고 PDGF-BB는 오 등<sup>72)</sup>의 논문에서 0.1, 1, 10, 100ng/ml 투여시 10ng/ml까지 세포증식능이 증가함으로써 0, 1, 10ng/ml 농도를 본 실험에 사용하였다.

이 연구에서 치주인대세포의 DNA 합성능에 대한 효과는 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF의 동시투여군과 TGF- $\beta_1$ 의 4 및 24 시간 전처리 배양군 모두에서 각 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF 단독투여군에 비해 10ng/ml PDGF 단독투여군에서 증가양상이 더 높게 나타났다. 이는 Canalis 등<sup>72)</sup>의 쥐의 두개관 조직배양시 결과와 Matsuda 등<sup>69)</sup>의 쥐의 치주인대세포, 그리고 Oates 등<sup>55)</sup>, 오 등<sup>72)</sup>의 사람 치주인대세포에서 나타난 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

또한 PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  병용투여군에서 DNA 합성능이 TGF- $\beta_1$ 의 농도 의존적으로 증가된 양상을 나타내었다. 그 정도는 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB는 동시투여군에서, 5ng/ml TGF- $\beta_1$  병용투여시 PDGF-BB 단독투여군에 비해 1ng/ml PDGF-BB는 병용투여군에서 약 1.6배, 10ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서는 약 1.3배 정도 DNA 합성능이 증가된 양상을 보였으며, 5ng/ml TGF- $\beta_1$ 을 4시간 전처리 한 경우는 PDGF-BB 단독투여군에 비해 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서 약 3.5배, 10ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서 약 4배 정도 DNA 합성능이 증가된 양상을 보였으며, 24시간 전처리 시에는 PDGF-BB 단독투여군에 비해 1ng/ml PDGF 병용투여군에서 약 3.8배, 10ng/ml PDGF 병용투여군에서는 약 2배 정도 DNA 합성능이 증가된 양상을 보였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 TGF- $\beta_1$ 은 치주인대세포에 대한 세포증식능을 더욱 촉진시킴을 알 수 있었다. 이 결과는 PDGF에 대한 치주인대세포의 증식반응이 TGF- $\beta_1$ 에 의해 촉진된다고 보고한 Oates 등<sup>55)</sup>과 Dennison 등<sup>54)</sup>의 결과와 일치한다.

이에 대한 기전은 Ishikawa 등<sup>57)</sup>의 논문으로 미루어 보아 TGF- $\beta_1$ 이 PDGF에 대한 반응 수용기인  $\alpha$ -

수용기의 발현을 증가시킴으로써 PDGF의 반응을 상승시키는 것으로 사료되며, Han 등<sup>74(66)</sup>의 논문으로 미루어 보아 TGF- $\beta_1$ 은 DNA 합성과정에 있어서 G<sub>1</sub>에서 S Phase로의 진행을 촉진시킴으로서 PDGF 투여시 DNA 합성능이 증가된 것으로 사료된다.

두 성장인자 동시투여시와 TGF- $\beta_1$  4 및 24 시간 전처리 배양시의 DNA 합성능 비교시 1ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서는 동시투여군에 비해 4시간과 24시간 전처리 배양군의 증식능이 더 높게 나타났으며 10ng/ml PDGF-BB 병용투여군에서는 4시간 전처리 배양군에서보다 높게 나타났으며 24시간 전처리 배양군에서는 동시투여군에 비해 약간 높게 나타났으나 4시간 전처리 배양군보다는 합성능이 감소된 경향을 나타내었다. 이는 고농도(10ng/ml)의 PDGF-BB를 투여함으로써 Pteilschfer 등<sup>75</sup>의 연구에서 보고된 바와 같이 시간경과에 따라 성장인자 농도와 수용기 수간의 비율의 변화에 의한 세포반응의 감소에 의한 것으로 사료된다.

이 연구에서 치주인대세포의 총단백질과 교원질 합성능에 대한 효과를 알아본 실험의 결과로는 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB 동시투여군과 TGF- $\beta_1$  4 및 24시간 전처리 배양군 모두에서 대조군에 비해 1 및 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군에서 농도 의존적으로 총단백질 합성량, 교원질합성능이 증가되는 경향을 나타내었는데 이는 오 등<sup>72</sup>과 Canalis<sup>73</sup> 등의 실험 결과와 거의 일치하였다.

또한 모든 실험군에서 PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  병용투여군에서 총단백질과 비교원성 단백질의 합성능이 높게 나타났으며 교원질합성능은 두 성장인자 동시투여군의 10ng/ml PDGF-BB 투여군을 제외하고는 모두 증가된 양상을 보였으나 총단백질에 대한 교원질 합성의 상대적 비율은 PDGF-BB 단독투여군보다 TGF- $\beta_1$  병용투여군에서 감소하는 경향을 나타내었다.

이 실험의 결과로 미루어 보아 앞에서 언급한 바와 같이 TGF- $\beta_1$ 은 PDGF에 대한  $\alpha$ -수용기의 발현을 증가시킴<sup>77</sup>으로써 PDGF의 치주인대세포에 대한 작용을 촉진시켜 총단백질, 교원질, 비교원성 단백질 합성능이 높게 나타난 것으로 사료되며 두 성장인자

동시투여군의 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 PDGF-BB 단독투여군에 비해 TGF- $\beta_1$  병용투여군이 농도 의존적으로 교원질합성능이 약간 감소되어 나타난 것은 Kawamoto 등<sup>76</sup>의 연구에서 보고한 바와 같이 농도가 증가함에 따라 성장인자에 대한 새로운 수용체의 합성에 많은 양의 에너지가 소비되고 Pteilschfer 등<sup>75</sup>의 연구에서 보고된 바와 같이 성장인자 농도와 수용기 수간의 비율의 변화에 의한 세포반응의 감소에 의한 것으로 사료된다. 또한 두 성장인자 동시투여시와 TGF- $\beta_1$ 을 4 및 24 시간 전처리 배양시 총단백질에 대한 교원질의 상대적 비율이 감소하는 경향을 보임으로써 치주인대세포의 교원질합성능을 특이하게 증가시키지는 않는다고 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 치주인대세포에서 TGF- $\beta_1$ 은 PDGF-BB의 기능을 조절하는 능력을 가지고 있으며 두 성장인자를 투여시 동시투여시보다 TGF- $\beta_1$ 을 전처리 해 줌으로써 PDGF-BB의 반응을 더욱 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 성질을 잘 파악하여 두 성장인자를 치주조직에 투여시 치주치치 후 치주조직재생에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 두 성장인자의 상호작용에 대한 기전을 규명하는 연구가 부가적으로 시행이 된다면 치주조직재생을 위한 병용적용에 보다 더 기여하게 될 것으로 사료된다.

## V. 요약

이 연구는 배양된 치주인대세포에 TGF (Transforming growth factor)- $\beta_1$ 과 PDGF(Platelet-derived growth factor)-BB를 농도별로 혼합 주입해서 세포의 증식능, 단백질 및 교원질 합성능을 측정해 봄으로써 TGF- $\beta_1$ 이 치주인대세포의 증식과 활성화에 대한 PDGF-BB의 효과를 상승시킬 수 있는지 알아보고자 본 실험을 실시하였다. 교정치료를 위해 내원한 환자로 부터 건강한 제일소구치를 발거하여 치주인대세포를 분리, 배양하여 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB를 동시에 주입한 군과 TGF- $\beta_1$ 를 4, 24시간 전처리 배양한 군과 나누어 실험하였다. TGF- $\beta_1$ , PDGF-

BB을 주입하지 않은군을 대조군으로 하여 DNA 합성능, 총단백질과 교원질 합성능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

치주인대세포에 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB을 동시 주입하였을 때 DNA 합성능의 효과는 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 증가 양상이 높았고 PDGF-BB 단독 투여군보다 TGF- $\beta_1$  병용 투여군에서 DNA 합성능이 증가된 양상을 나타내었으며 5ng/ml TGF- $\beta_1$ 과 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 가장 높은 증가 양상을 보였다.

TGF- $\beta_1$  4시간과 24시간 전처리 배양군 양군 공히 1ng/ml PDGF-BB 투여군을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 증가 양상이 더 높았고 PDGF-BB 단독 투여군보다 TGF- $\beta_1$  전 처리군에서 DNA 합성능이 증가된 양상을 나타내었으며 5ng/ml TGF- $\beta_1$  전 처리 후 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 가장 높은 증가 양상을 보였다.

치주인대세포에 TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB을 동시 주입하였을 때 총단백질합성량은 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 증가 양상이 더 높게 나타났다. PDGF-BB 단독 투여군보다 TGF- $\beta_1$  병용 투여군에서 총단백질 합성량이 증가된 양상을 나타내었다.

TGF- $\beta_1$  4과 24시간 전처리 배양군의 총단백질 합성량은 대조군에 비해 모든 군에서 증가된 양상을 보였으며 1ng/ml PDGF-BB 투여군에 비해 10ng/ml PDGF-BB 투여군에서 증가 양상이 더 높았고 TGF- $\beta_1$  전처리 배양군이 PDGF-BB 단독 투여군보다 총단백질 합성량이 증가된 양상을 나타내었다.

TGF- $\beta_1$ 과 PDGF-BB를 동시 투여하였을 때 대조군에 비해 모든 군에서 교원질 합성능이 증가하는 경향을 나타내었으며, 비교원성단백질의 합성능은 1, 10ng/ml PDGF-BB 단독투여군을 제외하고 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다. 총단백질에 대한 교원질 합성의 상대적 비율 PDGF-BB 단독 투여

군보다 TGF- $\beta_1$  병용 투여군에서 감소하는 경향을 나타내었다.

TGF- $\beta_1$  4과 24시간 전처리 배양군의 교원질과 비교원성 단백질 합성능은 대조군에 비해 모든 군에서 교원질과 비교원성 단백질 합성능이 증가하는 경향을 나타내었으며 PDGF-BB 단독 투여군보다 TGF- $\beta_1$  병용 투여군에서 총단백질 합성량이 증가된 양상을 나타내었으며 그 정도는 TGF- $\beta_1$ 의 농도 의존적인 양상을 보였다. 총단백질에 대한 교원질 합성의 상대적 비율은 TGF- $\beta_1$  4, 24시간 전처리 배양군 모두에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 치주인대세포에서 TGF- $\beta_1$ 은 PDGF-BB의 기능을 조절하는 능력을 가지고 있으며 두 성장인자 주입시 동시주입시보다 TGF- $\beta_1$ 을 전처리 해 줌으로써 PDGF-BB의 반응을 더욱 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

## VI. 참고문헌

1. Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Platen, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue, J. Clin. Periodontol., 7 : 394-401, 1980.
2. Gould, T. R. L., Melcher, A. H. and Brunette, D. M. : Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding, J. Periodont. Res., 15 : 20-42, 1980.
3. McCulloch, C. A. G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice, Anat. Rec., 211 : 258-262, 1985.
4. Davidson, L. and McCulloch, C. A. G. : Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations, J. Periodont. Res., 21 : 414-428, 1986.
5. Aukhil, I., Simpson, D. M., Suggs, C. and Pettersson, E. : In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament : An experimental study using physical barriers, J. Clin. Periodontol., 13 : 862-868, 1986.
6. Shore, R. C. and Berkovitz, B. K. B. : An ultra-

- structural study of periodontal ligament fibroblasts in relation to their possible role in tooth eruption and intracellular collagen degradation in the rat, *Archs. Oral Biol.*, 24 : 155-164, 1979.
7. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament : An experimental study in the monkey, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 257-265, 1982.
  8. Narayanan, A. S. and Page, R. C. : Connective tissue of the periodontium : A summary of current work, *Collagen Rel. Res.*, 3 : 33-64, 1983.
  9. Fernyhough, W. and Page, R. C. : Attachments, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots, *J. Periodontol.*, 54 : 133-140, 1983.
  10. Kleinman, H. K., Klebe, R. J. and Martin, G. R. : Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells, *J. Cell Biol.*, 92 : 473-479, 1981.
  11. Terranova, V. P., Nishimura, F., Price, R. M., Ye, J. : Polypeptide stimulation of periodontal regeneration, *Periodont. Case Rep.*, 13 : 6-12 1991.
  12. Terranova, V. P., and Wikesj?, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium, *J. Periodontol.*, 58 : 371-380, 1987.
  13. Graves, D. T. and Cochran, D. L. : Mesenchymal cell growth factors, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1 : 17-36, 1990.
  14. Hintz, R. L. and Liu, J. : Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45 : 988-995, 1977.
  15. Ross, R., Raines, E. W. and Bowen-Popo, f. : The biology of platelet-derived growth factor, *Cell*, 46 : 155-169, 1986.
  16. Stiles, C. D. : The molecular biology of platelet-derived growth factor, *Cell*, 33 : 653-659, 1983.
  17. Kohler, N. and Lipton, A. : Platelet as a source of fibroblast growth promoting activity, *Exp. Cell Res.*, 87 : 297-301 : 1974.
  18. Antoniades, H. N. : Human platelet-derived growth factor(PDGF) : Purification of PDGF- I and PDGF-II and separation of their reduced subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78 : 7314-7317, 1981.
  19. Deuel, T. F., Huang, J. S., Proffit, R. I., Baenzinger, J. U., Chang, D. and Kennedy, B. B. : Human platelet-derived growth factor purification and resolution into two active protein fractions, *J. Biol. Chem.*, 256 : 8896-8899, 1981.
  20. Heldin, C. H. , Backstrom, G. and Ostman, A. : Binding of different dimetric forms of PDGF to human fibroblasts evidence for two separate receptor types, *EMBO J.*, 7 : 1387-1393 1988.
  21. Raines, E. W. and Ross, R. : Platelet-derived growth factor I, High yield purification and evidence for multiple forms, *J. Biol. Chem.*, 257 : 5154-5160, 1982.
  22. Williams, L. T. : Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor, *Science*, 243 : 1564-1570, 1987.
  23. Hawinger, J. : Platelet secretory pathway : An overview, *Method, Enzyme.*, 169 : 191-195, 1989.
  24. Rappolee, D. A., Mark, D. and Banda, M. J. : Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo : Analysis of mRNA phenotyping, *Science.*, 241 : 707-712, 1988.
  25. Antoniades, H. N., Galanopoulos, T. and Neville-Golden, T. : Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor(PDGF) and PDGF receptor in RNA's in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.*, 88 : 565-569, 1991.
  26. Sitarus, N. M., Sariban, E. and Pantagis, P. : Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and synthesize PDGF-like

- mitogen, *J. Cell Physiol.*, 132 : 376-380, 1987.
27. Hauschka, P. C., Mavrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E. and Klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix, *J. Biol. Chem.*, 261 : 12665-12674, 1986.
  28. Deuel, T. F., Senior, R. M., Huang, J. S. and Griffin, G. L. : Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor, *J. Clin. Invest.*, 69 : 1046-1049, 1982.
  29. Senior, R. M., Griffin, G. L. Hwang, J. S. Walz, D. A. and Deuel, T. F. : Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts, *J. Cell Biol.*, 96 : 382-385, 1983.
  30. Tzeng, D. Y., Deuel, T. F., Hwang, J. S. and Baehner, R. L. : Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation, *Blood*, 66 : 179-183, 1985.
  31. Bauer, E. A., Cooper, T. W. Hwang, J. S., Altman, J. and Deuel, T. F. : Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 : 4132-4136, 1985.
  32. Paulsson, Y., Hammacher, A., Heldin, C. H. and Westermark, B. : Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature(Lond.)*, 328 : 715-717, 1987.
  33. Blatti, S. P., Foster, D. N., Ranganathan, G., Moses, H. L. and Getz, M. J. : Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85 : 1119-1123, 1988.
  34. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, Z. : A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71 : 1207-1210, 1974.
  35. Kohler, N. and Lipton, A : Platelets as a source of fibroblast growth promoting activity, *Exp. Cell Res*, 87 : 297-301 : 1974.
  36. Pich, J. E. and Graves, D. T : Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells : a comparison with human fibroblast, *Bone*, 10 : 131-138, 1989.
  37. Rutherford, R. B., TrilSmith, M. D., Ryan, M. E. and Charette, M. F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factor mitogenesis in vitro, *Arch. Oral Bio.*, 37 : 139-145, 1992.
  38. 장영명, 이만섭 : 혈소판유래성장인자가 치주조직의 재생에 미치는 영향에 관한 연구, *경희치대 논문집*, 13 : 133-146, 1991.
  39. 조무현, 박준봉 : 혈소판유래성장인자-BB가 성견 치근이개부병변의 조직 재생에 미치는 효과. *대한치주과학회지*, 23 : 535-563, 1993.
  40. Robert, A. B., Sporn, M. B., Assoian R. K., Smith, S. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H. and Fauci, A. S. : Transforming growth factor type  $\beta$ : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 : 4167-4171, 1986.
  41. Ignatz, R. A. and Massague, J. : Transforming growth factor  $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix, *J. Biol. Chem.*, 261 : 4337-4335, 1986.
  42. Ignatz, R. A., Endo, T. and Massague, J. : Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-  $\beta$ , *J. Biol. Chem.*, 262 : 6443-6446, 1987.
  43. Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R. G. K., Minne, H. W., and Ziegler, R. : Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors : a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth

- factor  $\beta$  *Endocrinol.*, 127 : 69-75, 1990.
44. Strong, D. D., Beachler, A. L., Wergedal, J. E. and Linkhart, T. A. : insulin-like growth factor II and transforming growth factor  $\beta$  regulate collagen expression in human osteoblastlike cells in vitro, *J. Bone Min. Res.*, 6 : 15-23, 1991.
  45. Roberts, A. B. and Sporn, M. B. : The transforming growth factor- $\beta$ s. In : Sporn, M. B. and Roberts, A. B. eds. *Peptide growth factors and their receptors*, Berlin, Springer-Verlag : 419-472, 1990.
  46. Roberts, A. B., Frolik, C. A., Anzano, M. A. and Sporn, M. B. : Transforming growth factor from neoplastic and nonneoplastic tissues, *Fed. Proc.*, 42 : 2621-2626, 1983.
  47. Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J. : Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by transforming growth factor- $\beta$ 1 and concanavalin A : Regulation of matrix metalloproteinases and TIMP, *J. Periodont. Res.*, 26 : 279-282, 1991.
  48. Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J. : Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-KDa gelatinase / type IV collagenase by transforming growth factor- $\beta$ 1 in human fibroblasts : comparison with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression, *J. Biol. Chem.*, 266 : 14064-14071, 1991
  49. Burgess, A. W. : Epidermal growth factor and transforming growth factor - alpha, In : Waterfield MD, ed. *Growth factors*, Br. Med. Bull., 45 : 401-424, 1981.
  50. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L. M., Roche, N. S., Stern, D. F. and Sporn, M. B. : Type  $\beta$  transforming growth factor : A bifunctional regulator of cellular growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 : 119-123, 1985.
  51. Derynck R. : Transforming growth factor and transforming growth factor - alpha : Structure and biological activities, *J. Cell Biochem.*, 32 : 293-304, 1986
  52. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M. and Assoian, R. K. : Transforming growth factor- $\beta$ : Biological function and chemical structure, *Science*, 233 : 532-534, 1986.
  53. Seyedin, S. M., Thompson, A. Y. and Bertz, H. : Cartilage inducing factor : Apparent identity to transforming growth factor- $\beta$  J. *Biol. Chem.*, 261 : 5693-5695, 1986.
  54. Dennison, D. K., Vallone, D. R., Pinero, G. J., Rittman, B. and Caffesse, R. G. : Differential effect of TGF - $\beta$ 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts, *J. Periodontol.*, 65 : 641-648, 1994.
  55. Oates, T. W., Rouse, C. A. and Cochran, D. L. : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro, *J. Periodontol.*, 64 : 142-148, 1993.
  56. Rizzino, A., Ruff, E. and Rizzino, H. : Induction and modulation of anchorage-independent growth by platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta, *Cancer Res.*, 46 : 2816-2820, 1986.
  57. Ishikawa, O., LeRoy, E. C. and Trojanowska, M. : Mitogenic effect of transforming growth factor  $\beta$ 1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-derived growth factor  $\alpha$  receptors, *J. Cell Phys.*, 145 : 181-186, 1990.
  58. Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M. B. and Deuel, T. F. : Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- $\beta$  *Science(Wash, DC)*, 237 : 1333-1335, 1987.
  59. Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. Gramates, P. and Deuel, T. F. : Transforming growth factor  $\beta$  reverses the glucocorticoid-induced wound healing deficit in



- rats and is regulated by platelet derived growth factor in macrophages, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86 : 2229-2233, 1989.
60. Piché, J. E., Carnes, D. L. and Graves, D. T. : Initial characterization of cells derived from human periodontia, J. Dent. Res., 68 : 761-767, 1989.
61. Peterkofsky, B. and Diegelman, R. : Use of a mixture of protein free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins, Biochemistry, 10 : 988-994, 1971.
62. Peterkofsky, B. and Brater, W. D. : Increased collagen synthesis in Kirsten sarcoma virus transformed BALB 373 cells grown in the presence of dibutyryl cyclic AMP, Cell, # : 291-299, 1974.
63. Roberts, A. R., Anzano, M. A., Wakefield, L. M., Roche, N. S., Stern, D. F. and Sporn, M. B. : Type  $\beta$  transforming growth factor : A bifunctional regulator of cellular growth, Proc. Natl. Acad. Sci., 82 : 119-123, 1985.
64. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., and Assoian, R. K. : Transforming growth factor- $\beta$  : Biological function and chemical structure, Science, 233 : 532-534, 1986.
65. Assoian, R. K., Komoriya, O. A., Meyers, C. A., Miller, D. M. and Sporn, M. B. : Transforming growth factor- $\beta$  in human platelets, J. Biol. Chem., 258 : 7155-7160, 1983.
66. Nister, M., Hammacher, A., Mellstrom, K., Siegbahn, A., Ronnstrand, A., Westermark, B. and Heidin, C. H. : A glioma-derived PDGF : A chain homodimer has different functional activities than a PDGF-AB heterodimer from human platelets, Cell, 52 : 791-803, 1988.
67. Kazlauskas, A., Bowen-Pope, D., Seifert, R., Hart, C. F. and Cooper, J. A. : Different effects of homo- and heterodimers of platelet-derived growth factor and chains on human and mouse fibroblasts, EMBO J., 7 : 3727-3731, 1988.
68. Ramakrishnan, P. R. and Cho, M. I. : Identification of platelet-derived growth factor receptors on periodontal ligament cells, J. Dent. Res., 71 : 176 Abst. No. 563, 1992.
69. Matsuda, N., Lin, W-L., Kumar, N. M., Cho, M. I. and Genco, R. J. : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, J. Periodontol., 63 : 515-525, 1992.
70. 조은경, 이재목, 서조영 : 변형성장인자- $\beta_1$ 이 치주인대세포와 치은섬유아세포의 증식에 미치는 영향, 대한치주과학회지, 25 : 720-732, 1995.
71. 김미정, 이재목, 서조영 : 변형성장인자- $\beta$ 가 치주인대세포와 치은섬유아세포의 교원질 합성에 미치는 영향, 대한치주과학회지 출판증
72. 오상덕, 이재목, 서조영 : 혈소판유래성장인자-BB가 치주인대세포의 세포 활성화에 미치는 영향에 대한 연구, 대한치주과학회지, 24 : 303-320, 1994.
73. Canalis, E., McCarthy, T. L. and Centrella, M. : Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro, J. Cell. Physiol., 140 : 530-537, 1989.
74. Han, E. K., Guadagno, T. M., Dalton, S. L. and Assoian, R. K. : A Cell cycle and mutational analysis of anchorage-independent growth : Cell adhesion and TGF- $\beta$  control G<sub>1</sub>/S transit specifically, J. Cell Biol., 122 : 461-471, 1993.
75. Pfeilshifter, J., Wolf, O., Naumann, A., Minne, H. W., Mundy, G. R. and Ziegler, R. : Chemotactic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor- $\beta$  J. Bone. Min. Res., 5 : 825-830, 1990.
76. Kawamoto, T., Sato, J. D., Le, A., Polikoff, J., Sato, G. and Mendelsohn, J. : Growth stimulation of A 431 cells by epidermal growth factor : Identification of high-affinity anti-receptor monoclonal antibody, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80 : 1337-1341, 1983.

## The Effect of TGF- $\beta_1$ on Cellular Activity of Periodontal Ligament Cells activated by PDGF-BB

Sang-Churl Baek, Jin-Woo Park, Jo-Young Suh

Department of Periodontology, College of Dentistry Kyungpook National University

The purposes of this study is to evaluate the combination effects of TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB on the periodontal ligament cells to use as a regeneration promoting agent of periodontal tissue. Human periodontal ligament cells were prepared from the first premolar tooth extracted for the orthodontic treatment and were cultured in DMEM/10% FBS at the 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. Authors measured the DNA synthesis, total protein, collagen and noncollagenous protein synthesis according to the concentration of TGF- $\beta_1$ , (1, 5ng/ml) and PDGF-BB (1, 10 ng/ml) in combination. To explore further this delayed effect of TGF- $\beta_1$ , we preincubated human periodontal ligament cells with TGF- $\beta_1$  for 4 or 24 hours before PDGF-BB stimulation.

The results were as follows:

The DNA synthetic activity was increased dose dependently by TGF- $\beta_1$ , PDGF-BB. The combination of TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB consistently enhanced the DNA synthetic activity to PDGF-BB alone. The ability of TGF- $\beta_1$  to enhance DNA synthetic activity in PDGF-BB treated periodontal ligament cells was dose dependent. The maximum mitogenic effect was at the 5ng/ml of TGF- $\beta_1$  and 10ng/ml of PDGF-BB. Preincubation of cells with TGF- $\beta_1$  resulted in significantly greater response to PDGF-BB at all TGF- $\beta_1$  concentration studied, and may be useful for clinical application in periodontal regenerative procedures. The total protein, collagen and noncollagen synthesis was increased dose pendently by TGF- $\beta_1$ , PDGF-BB. The % of collagen was slightly decreased according to the concentration of TGF- $\beta_1$ , PDGF-BB. The effect of TGF- $\beta_1$ , PDGF-BB were not specific for collagen synthesis since it also increased noncollagenous protein synthesis.

This study demonstrates that PDGF-BB is major mitogens for human periodontal ligament cells in vitro, and supports a role for TGF- $\beta_1$  as a regulation of the mitogenic and total protein formation to PDGF-BB in these cells.