

# Calcium sulfate와 혈소판 유래성장인자의 혼합사용이 치주인대세포에 미치는 영향

김준성\* · 최성호\* · 유윤정\*\* · 채종규\* · 김종관\* · 조규성\*

연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소\*

연세대학교 치과대학 구강생물학교실\*\*

## I. 서론

치주치료의 궁극적인 목적은 치주질환에 의하여 상실된 치주조직의 구조적인 재생과 기능회복에 있다. 치주조직재생이란 질환에 이환된 부위에 신생골, 신생백악질과 함께 새로운 치주인대섬유가 기능적으로 삽입, 배열되어 재형성이 나타난 치유양상을 말한다. 치주조직의 치유양상에 관계하는 조직으로는 치은상피, 치은결체조직, 치조골과 치주인대 등의 4가지 결합조직으로 구성된다. Melcher<sup>1)</sup>는 상처부위에 이러한 조직에서 유래한 세포들이 재집결하는 표현형에 따라 치유양상이 결정된다고 하였고 Nyman등<sup>2)</sup>은 치은상피와 치은결체조직을 배제한 실험에서 치주조직재생에 있어서 치주인대세포가 중요한 역할을 한다고 처음 시사하였다. 치주인대세포는 섬유아세포, 조골세포, 백악질세포 등을 함유하고 있고 모든 결합조직세포로 분화할 수 있는 복합적인 기능을 지닌 미분화중배엽세포로 구성되어 치주조직재생에 기여한다고 알려졌다<sup>3)</sup>. 파괴된 치주조직의 재생을 위해 크게 다양한 골이식술과 치주조직유도재생술이 행해져 왔다.

골이식술의 경우 자가골이 가장 유리한 이

식재로 알려졌지만 채취에 따르는 부가적인 수술, 광범위한 결손부위에 대한 대량공급의 어려움, 이식시 형태부여 결여 등의 단점이 지적되었다. 따라서 이를 대신할 대체물질에 대한 연구가 이루어졌으나 흡수시기, 재료자체의 염증, 숙주의 거부반응, 질병전이 등의 가능성도 개진되었다.

따라서 조직이 쉬우면서 체내에서 안전하게 골형성을 유도할 수 있는 이식재에 대한 관심이 대두되기 시작했다. Calcium sulfate는 1950년대부터 치과에서 사용되기 시작했으며 안정한 골대체물로 인정되어왔다<sup>4, 5)</sup>.

Weinmann등<sup>6)</sup>은 미분화세포가 조골세포로 분화하기 위한 가장 보편적인 자극제를 칼슘염이라 규정하였고, Peltier등<sup>7)</sup>, Calhoun등<sup>5)</sup>, Radentz등<sup>8)</sup>, Bell<sup>9)</sup>은 개를 통한 생체실험에서, Shaffer등<sup>10)</sup>은 사람의 치조골에 각각 calcium sulfate를 이식시 빠른흡수와 우수한 생체적합성을 띄나 신생골 형성은 유도하지 못한다고 보고하였다.

이상의 연구에서 calcium sulfate는 골조직의 재생에 있어서 질적인 향상을 가져왔지만 이것은 calcium sulfate자체의 골형성 유도능력에 의해서가 아니라<sup>4, 7, 9, 10)</sup>, 치유기간 동안 상처의 안정과 상피의 근단이동을 억제하고<sup>8, 10)</sup>

혈병의 유지, 주위의 미분화세포들이 손상부위로 이주할 수 있는 공간유지기능에 의한 결손부위를 채우는 성질<sup>4, 7, 8, 9)</sup>에 의해 나타나는 결과라 할 수 있으며 어떠한 결과도 일관되지 않았다.

한편 치주조직유도재생술에는 차단막이 유용하게 이용되어지고 있다. 차단막의 재료로는 흡수성과 비흡수성으로 구별이 되며 흡수성으로는 polylactic acid polymer<sup>11)</sup>, oxidized cellulose<sup>12)</sup>, vicryl mesh<sup>13)</sup>, collagen membrane<sup>14, 15)</sup> 등이 있으며 비흡수성으로는 현재까지 널리 쓰이는 polytetrafluoroethylene (PTFE)막이 있다.

이러한 차단막의 사용은 이전의 전통적인 치주치료의 많은 한계를 극복할 수 있는 가능성을 제시해주고 있지만 골결손의 형태, 치유기간, 차단막의 종류, 판막위치, 치은퇴축, 구강위생상태, 전신적 건강 등의 여러요소에 의해 많은 차이를 보인다<sup>16, 17)</sup>.

현재까지 많이 쓰이는 PTFE막인 경우 차단막 제거를 위한 부가적인 이차수술이 필요하고 초기 치유과정중 차단막이 판막의 치은과 골, 치주인대의 혈관과의 문합을 방해함으로써 치은퇴축을 자주 야기하는데<sup>18, 19)</sup> 이러한 치은퇴축에 의한 차단막의 노출은 병원성세균의 감염기회를 증가시키고 치태조절을 곤란하게 하는등 치주조직 재생을 방해한다<sup>20, 21, 22)</sup>.

따라서 치은퇴축을 최소로 하고 불규칙한 형태의 결손부에 손쉽게 접근하여 견고하게 접착할 수 있으며 2차 수술이 필요없는 흡수성 차단막에 대한 필요성이 제기되었다. 그리하여 간단하고 저렴하며 인체에 무해한 골이식재로 사용되는<sup>4, 7, 23)</sup> calcium sulfate를 새로운 차단막의 재료로 하는 연구가 이루어졌다.

Sottosanti<sup>24)</sup>는 발치외에 decalcified freeze-dried bone(DFDB)와 calcium sulfate를 혼합이식후, 이 이식재위에 calcium sulfate를 덮어줌으로써 차단막 역할을 하게하여 신생골 형성

유도효과를 증진시키며 상피의 근단이동을 억제시킬 수 있다고 보고하였으며 Anson<sup>25)</sup>, Conner<sup>26)</sup>도 역시 같은 결과를 보고하였다.

그러나 Aukhil 등<sup>27)</sup>은 차단막은 치주조직 재생과정에 있어서 필요한 세포학적인 과정(즉, 증식, 이주, 기질합성)을 증진시키지 못한다고 하였으며 차단막을 사용한 경우와 비교시 치주조직재생에 크게 도움이 되지 않는다고 보고하였다.

최근 세포생물학의 발전으로 치주조직을 구성하고 있는 세포에 대한 연구가 활발히 진행되어 각종세포의 고유성상이 규명되고 세포와 세포의 기질의 특이한 상호작용과 함께 다양한 polypeptide계 성장인자들이 세포의 증식, 이주, 기질합성에 영향을 미침으로써 세포의 성장 형성기능을 조절하는 것으로 알려져 치주조직 재생에 중요한 역할을 담당한다고 밝혀졌다<sup>28)</sup>.

Polypeptide계 성장인자는 구조와 기능에 있어서 호르몬과 유사하지만 국소적으로 더 강력한 효과가 있으며 특이표적 세포에 이동하는 수단이 다양한 것으로 알려졌다.<sup>28)</sup> 수많은 종류의 성장인자 중 중배엽기원의 세포성장을 촉진하는 platelet-derived growth factor (PDGF)가 조직재생에 중요한 역할을 담당한다고 알려졌다. PDGF는 혈소판의  $\alpha$ -granule에서 생성되며<sup>29)</sup> 30KDa의 분자량을 가진 조절성단백질로서 2가지의 peptide 고리 A,B로 구성되는데 단종이량체(AA, BB)와 이종이량체(AB)의 3가지 동소체를 가지고 있으며 세포막에는  $\alpha$ 와  $\beta$ 형 두가지 형태의 수용기가 있는 것으로 알려졌다.<sup>30)</sup> In vitro에서는 Canalis<sup>31)</sup>, Matsuda등<sup>32)</sup> Oates등<sup>33)</sup>이, in vivo에서는 Lynch등<sup>34-36)</sup>, Rutherford등<sup>37)</sup>, Becker등<sup>38)</sup>이 PDGF의 적용시 효과를 보았다고 하였다. 이상의 실험에서 살펴보면, PDGF는 치주인대의 섬유아세포, 골아세포의 화학주성, 세포증식, 기질합성을 유도하며 insulin like growth factor- I (IGF- I)과 dexamethasone과

혼합투여시 상승작용을 나타낸다고 하였다. 그러나 이러한 성장인자의 경우 적용초기에 생체내로 빠른 흡수로 인해 조직재생효과를 격감시키고 아주 미세한 양이기 때문에 다루기 힘든 단점이 있다. 따라서 이러한 물질들이 치주임상에서 보다 쉽게 조작할 수 있고 적용후 우수한 조직재생 개선효과를 얻기 위해서는 어떠한 형태의 vehicle이 필요하다.<sup>34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43)</sup>

이러한 vehicle의 도움으로 적용하려는 생체재료가 일정한 부피를 유지하면서 초기 치유기간 적용부위에 있게하며 생체재료를 vehicle내에 흡착시켜 원하는 최소 초기 치유기간동안에 골 결손부로 서서히 유리되게 하는 것이 필요하다.<sup>37, 39, 40, 42, 43)</sup>

현재 Lynch등<sup>34, 35, 36)</sup>은 methylcellulose gel을, Rutherford등<sup>37, 42)</sup>은 collagen matrix를, Sigurdsson등<sup>43)</sup>은 autologous blood and poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticle(PLGA)을, Yamazaki등<sup>44)</sup>은 calcium sulfate를 사용하였다. 하지만 이러한 서로 다른 vehicle에 효과에 대한 보고가 확립이 안되었기 때문에 재료의 조작을 보다 쉽게하고 적용부위에 가능한 오래 유지될 수 있도록하며 생체재료의 조직재생효과를 한층 높일 수 있는 vehicle의 연구가 필요하다.

따라서 저자는 이상의 연구를 살펴본 결과 치주조직 재생에 있어서 치주인대세포가 중요한 역할을 하므로 calcium sulfate가 치주인대세포에 미치는 영향을 연구하기 위하여 치주인대세포를 calcium sulfate와 함께 배양하여 생체적합성을 규명하고 성장인자인 PDGF의 vehicle로서 사용가능성이 있는지를 관찰한 결과 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는

바이다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

#### (1) 치주인대세포의 배양

교정치료를 목적으로 발거한 건강한 치주조직을 함유한 제 1소구치를 hank's balanced salt solution(HBSS)\*로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거한다음 치근 중간 1/3부위에서 치주인대조직을 #15 blade로 채취하여 세절한다음 직경 25mm의 배양접시에 20% fetal bovine serum(FBS)\*, 100unit/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.5mg/ml amphotericin-B\*가 포함된  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM)\*을 넣고 37°C, 100%습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합배양기\*에서 배양하였다.

치주인대 세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층밀생이 형성되면 75mm 세포배양용접시를 이용하여 7-10일간 간격으로 계대배양하였다. 본 실험에서는 세포의 균일한 특성을 얻기위해 5-7세대의 세포를 사용하였다.

#### (2) calcium sulfate 용출액 제조

24 well 배양접시에 calcium sulfate\*\*를 1mm 두께로 간후 10% FBS가 함유된 2-MEM 2ml를 첨가하여 37°C의 항온에서 3일간 보관후 calcium sulfate 시편에서부터 분리되서 나온 불순물을 제거하기 위하여 여과기로 정제하였다.

#### (3) PDGF-BB의 제조

제조회사의 지시에 따라 10mM acetic acid 50  $\mu$ l에 95%이상의 순도의 recombinant

\*: Gibco/BRL Technologies Inc., U.S.A.

\*\* : Capset®, Lifecore biomedical CO., U.S.A.

\*\*\*: Recombinant human PDGF-BB homodimer, Genzyme., U.S.A.

# : Infred CO<sub>2</sub> Incubator®, Forma Scientific Inc., U.S.A.

PDGF-BB\*\*\* 36 $\mu$ l 을 용해하여 희석시킨 후 15ng/ml 농도로 제조 사용하였다.

## 2. 연구방법

### (1) 실험군 설정

$\alpha$ -MEM에서 배양한 세포군을 대조군으로 하고, calcium sulfate를 넣어 배양한 세포군을 calcium sulfate군으로, calcium sulfate에 PDGF를 주입하여 배양한 세포군을 calcium sulfate+PDGF군으로,  $\alpha$ -MEM에 PDGF를 주입하여 배양한 세포군을 PDGF군으로 실험군을 설정하였다.

### (2) 세포수 산정에 의한 세포증식도 측정

96 well의 배양접시에 각 well당  $1 \times 10^4$ 개의 치주인대세포를 가진 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ l를 넣은후 배양기에서 배양하였다. 배양하루 후 세포가 배양접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 배양액을 제거하고 대조군은 10% FBS와 10mM acetic acid가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ l를 재주입하고, calcium sulfate군은 calcium sulfate 용출액 200 $\mu$ l를, calcium sulfate+PDGF 군은 15ng/ml 농도의 PDGF-BB를 주입한 calcium sulfate 용출액 200 $\mu$ l를, PDGF 군은 15ng/ml 농도의 PDGF-BB를 주입한  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ l를 재주입하며 동일조건하에서 배양하였다.

배양 1일, 2일, 3일 후 배양접시에서 배양액을 제거하고 0.05% trypsin\*으로 부착세포로 분리한 다음 trypan blue\*로 염색하여 inverted light microscope\*\*하에서 혈구계수기로 세포수를 측정하였다. 위의 실험은 3회 반복하여 시행하였다.

### (3) MTT assay에 의한 세포증식도 측정

#### ① calcium sulfate 용출액을 이용

세포수 산정에서와 동일한 방법으로 96 well의 배양접시에 세포를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건하에서 배양하였다.

배양 1일, 2일, 3일 후 각각 배양접시에서 배양액을 제거하고 새로운 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 100 $\mu$ l를 각각의 well에 첨가시켰다.

생리식염수로 용해한 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)\*\*\*\*용액 150 $\mu$ l를 각 well에 첨가한 후 4시간동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 125 $\mu$ l의 dimethyl Sulfoxide (DMSO)\*\*\*\*를 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시킨 후 새로운 96 well 배양접시에 각각의 well에 50 $\mu$ l를 첨가하여 배양접시를 잘 흔든 후 ELISA reader\*\*\*로 파장 570nm로 흡광도를 측정하였다. 위의 실험은 3회 반복 시행하였다.

#### ② transwell을 이용

24 well의 배양접시에 각 well당  $1 \times 10^4$ 개의 치주인대세포를 가진 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ l를 넣은 후 배양기에서 배양하였다. 배양하루 후 세포가 배양접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 배양액을 제거하고 calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF군에서는 transwell을 설치하여 calcium sulfate를 1mm를 transwell바닥에 깔 후 calcium sulfate군은 calcium sulfate가 완전히 잠길수 있도록  $\alpha$ -MEM 2ml를, calcium sulfate+PDGF군에서는 15ng/ml 농도의 PDGF를 주입한  $\alpha$ -MEM 배양액 2ml를 재주입하고 대조군과 PDGF군은 calcium sulfate 용출액에서의 방법과 마찬가지로 하여 동일

##: Model CK-2, Olympus Co., Japan.

###: Model ETY-96, Toyo instrument Inc., Japan.

\*\*\*\*: Sigma Chemical Co., U.S.A.

조건 하에서 배양하였다.

배양 1일, 2일, 3일 후 각각 배양접시에서 배양액을 제거하고 새로운 10% 룬가 함유된  $\alpha$ -MEM 100 $\mu$ l를 각각의 well에 첨가시켰다.

생리식염수로 용해한 3-4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)\*\*\*\*용액 150 $\mu$ l를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 125 $\mu$ l의 dimethyl Sulfoxide (DMSO)\*\*\*\*를 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시킨 후 새로운 96 well 배양접시에 각각의 well에 50 $\mu$ l를 첨가하여 배양접시를 잘 흔든 후 ELISA reader\*\*\*로 파장 570nm로 흡광도를 측정하였다. 위의 실험은 3회 반복 시행하였다.

#### (4) Immunoblotting assay에 의한 교원질 합성 능 측정

세포수 산정에서와 동일한 방법으로 96 well의 배양접시에 세포를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건 하에서 배양하였다.

배양 1일, 2일, 3일 후 각각 배양접시에서 배양액을 제거하고 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM PMSF, 1%NP-40, 0.2%SDS가 첨가된 TBS buffer와 섞어서 세포 분해시킨 후 4°C에서 1시간동안 12000rpm에서 원심분리한 후 Bradford방법으로 정량분석 하였다.

새로운 96 well 배양접시에 각 well당 1 $\mu$ g의 goat anti-collagen type I 항체®를 깔고 항온 항습기에서 하루동안 배양 후 phosphate buffered saline-Tween(PBS-T)® 200 $\mu$ l로 1시간 blocking한 다음 3회 세척하였다. 1: 2000으로 희석한 goat anti-collagen type I 항체를 1시간 반응시킨다음 3회 세척한다. 2차 항

체 인 1: 1000으로 희석한 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG®을 1시간 반응시킨 다음 3회 세척하였다. O-phenylenediamine(OPD)\*\*\*\*를 buffer에 최소 20분 동안 녹인 후(이 때 light blocking이 필요) 분주하기 직전에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣어 분주하여 암실에서 20분동안 반응시킨 다음 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA reader\*\*\*로 파장 490nm로 흡광도를 측정하였다.

#### (5) 통계분석

각군에 있어서 분석은 비모수적 방법으로 Kruskal-Wallis test를 시행하고 다중비교는 Tukey's studentized range test를 시행하였으며 모든 실험에서 P<0.05를 유의한 수준으로 평가하였다.

### III. 연구결과

#### 1. 세포수 산정에 의한 세포증식도 측정

calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF 군에서 1일에 각각  $4.63 \pm 1.47$ ,  $4.93 \pm 1.80$ , 2일에  $4.37 \pm 1.50$ ,  $5.40 \pm 3.26$ , 3일에  $5.77 \pm 1.82$ ,  $6.87 \pm 1.06$ 으로 나타났으며 대조군에서는 1일에  $5.90 \pm 2.47$ , 2일에  $5.50 \pm 2.13$ , 3일에  $6.53 \pm 2.11$ 로 나타나 calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF군은 대조군과 비교시 1, 2, 3일에 유의성있는 차이가 없었고, PDGF군에서 1일에  $6.60 \pm 1.73$ , 2일에  $8.03 \pm 2.74$ 로 나타나 calcium sulfate군에 비해서 1일과 2일에 유의성있는 차이가 있었다(P<0.05)(표 1)(그림 1).

#### 2. MTT assay에 의한 세포증식도 측정

Ⓐ : Chemicon International Inc., U.S.A.

Ⓑ : Atlas Chemical Industries Inc., U.S.A

ⓒ : Amersham International Plc., England.

표 1 Effect of calcium sulfate on the proliferation of periodontal ligament cells by cell counting in calcium extracts(Mean±S.D)×10<sup>4</sup>

incubation time group	day 1	day 2	day 3
Control	5.90±2.47	5.50±2.13	6.53±2.11
Calcium Sulfate	4.63±1.47	4.37±1.50	5.77±1.82
Calcium Sulfate+PDGF	4.93±1.80	5.40±3.26	6.87±1.06
PDGF	6.60±1.73	8.03±2.74	8.33±3.52

- N=12
- Significant at P<0.05
- Statistical analysis carry out among groups against incubation time by Kruskal-Wallis test and Tukey's studentized range test
- \* between calcium sulfate and PDGF.

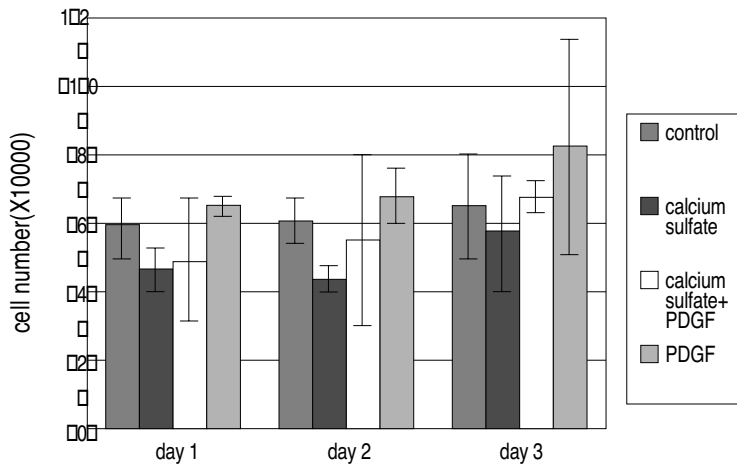


그림 1 Effect of calcium sulfate on the proliferation of periodontal ligament cells by cell counting in calcium sulfate extracts Cell number(Mean±S.D)×10<sup>4</sup>

#### (1) calcium sulfate 용출액을 이용

calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF 군에서 1일에 각각 0.69±0.32, 0.79±0.35, 2일에 0.53±0.16, 0.89±0.32, 3일에 0.51±0.17, 0.76±0.34로 나타났으며 대조군에서는 1일에 1.16±0.49, 2일에 0.37±0.16, 0.73±0.34로 나타나 calcium sulfate군과 calcium sulfate±PDGF 군은 대조군과 비교시 1, 2, 3일에 유의성있는 차이가 없었고 PDGF군은 2일에 0.81±0.18, 3

일에 0.90±0.37로 나타나 calcium sulfate군에 비해서 2일과 3일에 유의성있는 차이가 있었고 calcium sulfate+PDGF군도 calcium sulfate 군에 비해 2일에 유의성있는 차이가 있었다 (P<0.05)(표 2)(그림 2).

#### (2) transwell을 이용

calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF 군은 1일에 각각 0.30±0.05, 0.29±0.04, 2일에

표 2 Effect of calcium sulfate on the proliferation of periodontal ligament cells by MTT assay in calcium sulfate extracts(Mean±S.D)

group	incubation time		
	day 1	day 2	day 3
Control	1.16±0.49	0.37±0.16	0.73±0.34
Calcium Sulfate	0.69±0.32	0.53±0.16	0.51±0.17
Calcium Sulfate + PDGF	0.79±0.35	0.89±0.32	0.76±0.34
PDGF	0.98±0.46	0.81±0.18	0.90±0.37

- N=12
  - Significant at P<0.05
  - Statistical analysis carry out among groups against incubation time by Kruskal-Wallis test and Tukey's studentized range test.
- \* between calcium sulfate and calcium sulfate+PPGF      \*\* between calcium sulfate and PDGF

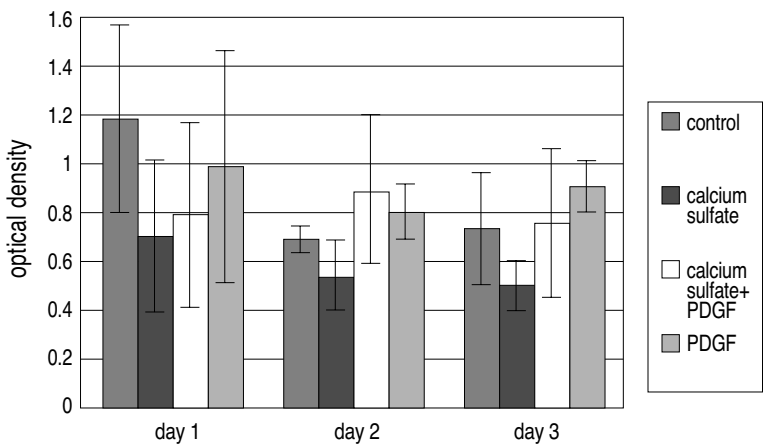


그림 2 Effect of calcium sulfate on the proliferation of periodontal ligament cells by MTT assay in calcium sulfate extracts

표 3 Effect of calcium sulfate on the proliferation of periodontal ligament cells by MTT assay in transwell(Mean±S.D)

group	incubation time		
	day 1	day 2	day 3
Control	0.46±0.21	0.68±0.24	0.82±0.16
Calcium Sulfate	0.30±0.05	0.56±0.22	0.49±0.32
Calcium Sulfate + PDGF	0.29±0.04	0.55±0.25	0.45±0.27
PDGF	0.44±0.09	0.59±0.28	0.81±0.14

- N=12
  - Significant at P<0.05
  - Statistical analysis carry out among groups against incubation time by Kruskal-Wallis test and Tukey's studentized range test.
- \* between calcium sulfate and control      \*\* between calcium sulfate+PDGF and control  
\*\*\* between calcium sulfate and PDGF      \*\*\*\* between calcium sulfate+PDGF and PDGF

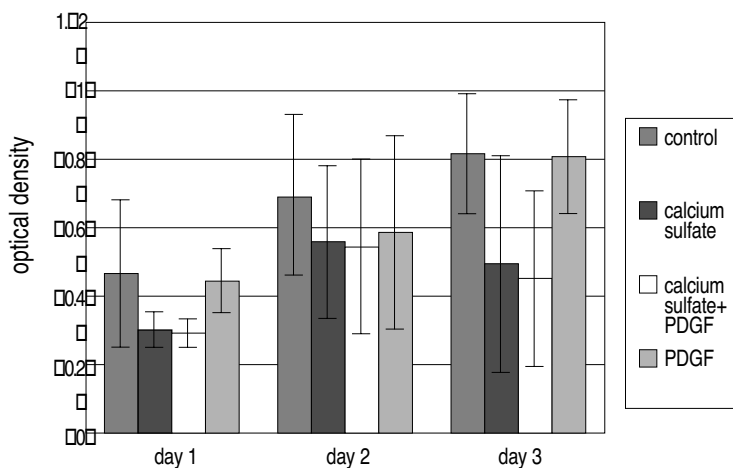


그림 3 Effect of calcium sulfate on the proliferation of periodontal ligament cells by MTT assay in transwell

표 4 Effect of calcium sulfate on collagen synthesis by immunoblotting assay in calcium sulfate extracts

incubation time group			
	day 1	day 2	day 3
Control	0.380	0.594	0.359
Calcium Sulfate	0.133	0.186	0.271
Calcium Sulfate + PDGF	0.363	0.172	0.236
PDGF	0.523	0.788	0.591

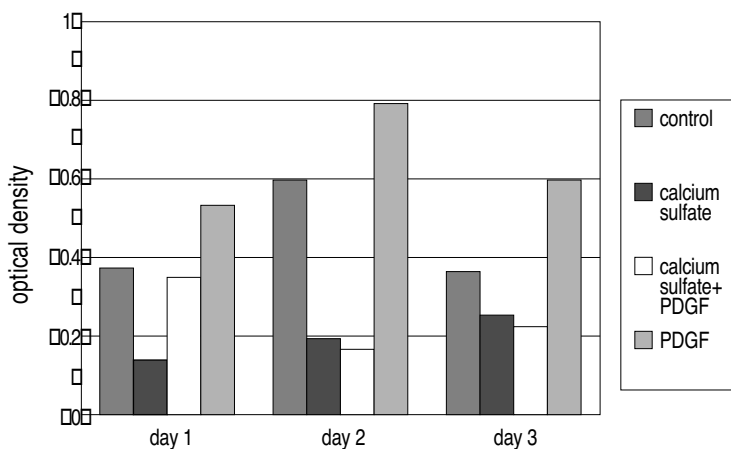


그림 4 Effect of calcium sulfate on collagen synthesis by immunoblotting assay in calcium sulfate extracts.

0.56±0.22, 0.55±0.25, 3일에 0.49±0.32, 0.45±0.27로 나타났으며 대조군과 PDGF군은 1일에

각각 0.46±0.21, 0.44±0.09, 2일에 0.68±0.24, 0.59±0.28, 3일에 0.82±0.16, 0.81±0.14로 나타



나 calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF 군은 대조군과 PDGF군에 비교시 1일에는 유의성있는 차이가 있었으나 2, 3일에는 유의성 있는 차이가 없었다( $P<0.05$ )(표 3)(그림 3).

### 3. Immunoblotting assay에 의한 교원질합 성능 측정

calcium sulfate군은 1일에 0.133, 2일에 0.186, 3일에 0.271로 나타나 점점 증가되는 양상을 보였고 PDGF군은 1일에 0.523, 2일에 0.788, 3일에 0.591로 나타나 2일에 높게 나타났으며 calcium sulfate+PDGF군은 1일에 0.363, 2일에 0.172, 3일에 0.236으로 나타나 1일에 높게 나타났다.

## VI. 총괄 및 고찰

치주치료는 치주질환으로 야기된 부위에 치조골과 백악질의 2개의 경조직에 치주인대라는 연조직이 삽입되어 기능적으로 배열되어 있는 조직재생을 목적으로 하고 있는데 Melcher<sup>1)</sup>, Nyman등<sup>2)</sup>에 의하면 치주인대세포가 치주조직재생에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

치주인대세포는 결합조직세포, 상피조직세포, 방어세포와 이와 관련된 신경혈관계성분 등의 4가지 성분으로 구성되어 있는데 특히 치주조직재생에 필요한 결합조직세포는 교원질을 합성하는 섬유아세포, 조골세포, 백악질세포, 주어진 환경에 의해 모든 결합조직세포로 분화할 수 있을만큼 복합기능을 지닌 미분화된 중배엽세포들을 함유하고 있다.<sup>3)</sup> 치주조직재생을 위해 다양한 골이식재와 치주조직유도재생술이 시행되었다. 골이식재중 calcium sulfate는 조작이 쉬우면서 체내에서 안전하게 사용할 수 있는 안정한 골이식재로 인정되어 왔다.<sup>4, 5)</sup>

Weinmann등<sup>6)</sup>은 미분화세포가 조골세포로

분화하기 위한 가장 보편적인 자극제를 감염이라 규정하였고 Peltier등<sup>7)</sup>은 개의 장골에서 calcium sulfate가 조직내에 특별한 염증없이 2개월내에 거의 흡수되며 조작이 간단하고 저렴하며 인체에 무해한 골이식재라 보고하였으며 Calhoun등<sup>5)</sup>은 개의 하악골 골절시 calcium sulfate를 이식시 대조군보다 2배이상의 골재생을 보인다고 발표하였으며 Radentz등<sup>8)</sup>과 Bell<sup>9)</sup>은 개의 치조골에 이식시 3-6주 사이에 흡수되고 12주후에는 신생골이 관찰된다고 보고하였다. Shaffer등<sup>10)</sup>은 사람의 치조골 결손부에 이식시 생체적합성이 우수하고 빠르게 흡수되나 신생골 형성은 유도하지 못한다고 보고하였다.

치주조직 재생에 있어서 여러 가지 이식재료를 이용할 때 기대되는 주된 기능은 지정된 부위에서 골을 포함하여 주위 치주조직이 정상적인 치유과정에 의해 재생되게 하는 환경을 만들어 주는 것이라 할 수 있으며 숙주-생체 재료간 상호작용이 골형성과 유지에 방해가 되어서는 안되는 것이다.

골이식재의 이상적인 조건은 이물반응이 없어야 하고, 빠르게 혈관이 형성되어야 하며, 새로운 숙주의 골조직으로 대체되어야 하며, 숙주에 의해 최소한의 표면흡수가 일어나야 된다고 Bell<sup>9)</sup>이 보고하였다.

이러한 기준에 볼 때 골이식재로서의 calcium sulfate는 골유도능력은 없지만<sup>7, 10)</sup> 신생골 성장속도와 같은 속도로 3-6주 정도가량의 빠른 흡수가 이루어지며<sup>4, 8, 9)</sup> 상피의 근단이동을 억제하고 조직결손부의 치유를 방해하지 않으며<sup>8, 10)</sup> 혈병의 유지와 주위의 미분화세포들이 손상부위로 이주할 수 있게끔 하는 공간유지기능<sup>4, 7, 8, 9)</sup>등의 성질을 띄고있어 Bell<sup>9)</sup>이 제시한 생체친화성, 흡수속도, 소공부여 가능성, 실용성면에 있어서 잘 부합되지만 목표하는 골재생을 유도할 수 없는 단점이 지적되고 있다.

한편 치주조직유도재생술에 차단막이 이용

되어지고 있는데 사용초기보다 많은 개선이 이루어졌음에도 불구하고 어떠한 형태의 차단막이건 간에 근본적인 문제는 광범위하게 분포된 다양한 결손조직의 외형에 정확히 적합하는 것이 상당히 어렵다는 것이다.<sup>45, 46)</sup>

차단막은 상처부위에 초기치유를 얻을 수 있는 곳에서만 이상적으로 이용되어 왔지만 더욱 새로워진 치주조직유도재생술 개념은 초기치유가 항상 일어나지 않는곳에서도 사용이 되었다.

그러나 가장 좋은 환경하에서도 초기 치유 기간동안 차단막의 노출이 일어나<sup>19)</sup>, 구강내 병원성 세균이 부착하여 군락을 형성함으로써 상처부위가 감염되어 조직재생에 손상을 준다고 보고되었다.<sup>22, 47)</sup>

또한 불규칙한 형태의 결손부에 정확히 접착이 어렵고<sup>24, 45, 46)</sup> 결손부위에서 적당한 형태의 공간의 크기와 형태를 유지할 수 있기 위해서 외부로부터의 압력에 저항할 수 있는 능력이 있어야 하나 종종 차단막이 함몰되어 치주조직 재생효과를 떨어뜨린다.<sup>19)</sup>

차단막상에서 초기 상처의 치유가 가능하지 않은 경우에는 차단막으로의 세포의 이주와 부착이 상처의 치유와 판막의 안정에 상당히 중요한 역할을 하는데<sup>48, 49)</sup> 이러한 관점에서 볼 때 PTFE막은 낮은 단백질 결합능력, 습윤성, 재료자체의 거친 표면구조로 인해 세포의 이주가 방해받을 받으며<sup>22)</sup> polylactic acid(PLA)은 기질표면의 변화가 상당히 심하여 세포의 이주가 방해된다고 하였다.<sup>50)</sup> 이에 반해 Sottosanti<sup>24, 45, 46)</sup>는 calcium sulfate는 초기치유를 얻을 수 없는 경우에도 상처의 치유가 이차적으로 촉진되어 거의 완전하게 재생된다고 보고하였다. 또한 calcium sulfate막은 PTFE막과 비교시 생체 적합성이 우수하며, 2-4주만에 완전히 흡수되어 2차 수술이 불필요하며, 다공성으로 인해 조직괴사가 일어나지 않으며, 상피조직을 배제할 수 있을만큼 치밀하면서 조직절개선을 따라 노출시 감

염이 거의 일어나지 않으며, 조작이 간단하고, 광범위한 골결손부에 유용하게 쓰일 수 있다고 하였다.

이상의 연구를 살펴본 결과 calcium sulfate는 골이식재로서만 아니라 차단막재료로서 치주조직재생에 도움을 줄 수 있다고 생각된다.

한편 Aukhil등<sup>27)</sup>은 차단막 자체는 치근면에 치주인대로부터 유래된 세포의 재집결을 유도하지만 치주조직재생에 필요한 증식, 이주, 기질합성 등의 세포과정들을 증진시키지 못하기 때문에 차단막을 사용하지 않은 경우와 비교시 큰 차이가 나지 않는다고 보고하여 이에 대한 연구가 진행되어 polypeptide계 성장인자가 세포과정에 중요한 역할을 담당한다고 밝혔다.

많은 성장인자 중 PDGF가 치주조직재생에 중요한 역할을 하는 치주인대세포의 활성화 기여를 하는데, Matsuda등은<sup>32)</sup> PDGF가 치유되어지고 있는 발치와 응고와로부터 유래되는 세포에 대해 상당히 친화성이 있으며 화학주성과 교원질합성을 촉진시킨다고 하였고, Oates등<sup>33)</sup>은 PDGF-AA, BB가 치주인대세포에 있어서 DNA합성을 촉진한다고 하였고, Rutherford등<sup>51)</sup>은 IGF- I, dexamethasone과 혼합 사용할 때 치주인대세포에서 DNA합성을 촉진한다고 보고하였다.

PDGF는 30KDa의 분자량을 가진 조절성 단백질로서 단종이량체(AA, BB)와 이종이량체(AB) 3가지 형태로 존재하는데, 세포막에는  $\alpha\beta$ 형 두가지의 수용기가 존재하며 PDGF-AA는  $\alpha$ 형 수용기에만 높은 친화력으로 결합하는 반면 PDGF-BB는  $\alpha\beta$ 형 두가지 형태의 수용기에 높은 친화력으로 결합함으로써 세포의 활성을 나타낸다고 하였으며<sup>30)</sup>, Matsuda<sup>32)</sup>등은 PDGF-BB가 PDGF-AB보다 낮은 농도에서 세포증식능과 화학주성에 더 큰 영향을 미쳐 세포막에  $\beta$ 형 수용기가 주로 존재한다는 것을 시사하였고, Oates등<sup>33)</sup>은 사

람의 치주인대세포에 PDGF- AA,BB를 주입하여 모두 DNA합성을 증가시킴으로써  $\alpha,\beta$ 형 수용기가 모두 존재한다는 것을 밝혔다.

이상에서 볼 때 치주인대세포가 세포막에 PDGF의  $\beta$ 형 수용기를 더 많이 함유하여 PDGF-BB가 치주인대 세포에 더 높은 친화성을 보인다고 간주할 수 있어 본 연구에서는 이상의 연구들을 근거로 하여 PDGF-BB를 연구재료로 사용하였다.

한편 성장인자의 농도설정에 있어서, 쥐의 치주인대세포에 PDGF 주입시 0.1~15ng/ml에서 DNA합성이 증가하였다고 보고한 Blom 등<sup>41)</sup>의 연구, 쥐의 치주인대세포에 PDGF 주입시 0.1ng/ml보다 10ng/ml 투여시 3배의 DNA합성의 증가가 있었다고 보고한 Matsuda 등<sup>32)</sup>의 연구, 사람에서 10ng/ml 투여시 최대한의 세포증식이 있었다고 보고한 Bartold 등<sup>39)</sup>의 연구, 사람에서 20ng/ml 투여시 치주인대세포에서 다른 실험군보다 세포증식이 촉진되었다고 보고한 Dennison 등<sup>52)</sup>의 연구, 사람에서 PDGF 투여시 농도가 증가함에 따라 DNA합성등이 증가하였고 10ng/ml가 적정량이라고 보고한 Oates 등<sup>33)</sup>의 연구를 근거로 하여 15ng/ml의 농도를 본 실험에서 사용하였다.

치과에서 사용되는 각종 재료와 약제들은 생체와 밀접한 관계를 가지므로 생물학적인 평가가 이루어져야 하므로 임상에 사용되기 전까지 in vitro에서부터 in vivo까지 다단계적인 생물학적인 평가가 이루어져야 한다.

따라서 단위세포를 이용하여 독성측정을 하여 생체적합성을 검증하는 것이 중요한데 일반적인 세포독성 측정검사 방법으로는 약제의 작용 후 생활세포수 산정방법, 세포분해 후 단백질 측정방법, 세포증식시 방사선 동위원소를 이용하는 방법들이 있다.

최근에는 색의 차이를 이용하여 세포의 수나 활성도를 알 수 있는 MTT가 널리 세포독성 측정방법에 이용되어 지고 있다. MTT 용

액속에 있는 tetrazolium ring이 활성화된 미토콘드리아내에 있는 dehydrogenase와 반응하여 비용해성의 짙은색 MTT formazan을 형성하게 된다.

MTT는 이러한 색의 변화정도를 ELISA reader를 이용하여 감지시켜서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포수나 활성정도를 알 수 있게 해주는 방법으로 다른 세포수 산정이나 방사선 동위원소 등을 이용하는 것보다 한번에 많은양을 정확하고 간단하게 측정하는 방법이다.<sup>53, 54)</sup>

본 실험의 세포수 산정과 MTT에 의한 세포활성도를 살펴보기 전에 세포의 성장양상을 살펴보는 것이 실험결과의 분석에 도움을 줄 것이라 사료된다.

세포는 초기 세포접종 후 세포수에 있어서 증가하는 양상이 거의없이 새로운 환경에 적응하려고 하는 “lag phase”, 세포수에 있어서 양적으로 폭발적으로 증가하여 세포의 균일한 특성을 유지하며 세포배양의 적절한 단계인 “log phase”, 성장율이 줄어들고 세포의 움직임이 둔화되며 세포수에 있어서 정체되어지는 기간인 “plateau phase” 등 3단계로 구분되어지는 전형적인 S자형 성장양상을 보인다<sup>53)</sup>.

본 실험에서 세포수 산정에 의한 세포증식도를 보면, 세포독성을 나타내는 약제가 단위 세포에 영향을 미치는 경우 시간이 경과함에 따라 세포독성이 서서히 증가하여 세포의 수가 감소되다가 최대로 독성효과를 나타내고 난 후 세포의 수가 정체되어가는 경향이 있다.<sup>53)</sup>

그러나 본 실험에서는 대체적으로 대조군, 실험군에서 시간이 경과함에 따라 모두 세포가 증식되는 전형적인 세포의 성장양상을 보였으며 특히 calcium sulfate군과 대조군과 비교시 유의차가 없는 것으로 볼 때, calcium sulfate가 치주인대세포에 유해한 독성을 미치지 않는 것으로 유추되어 생체적합성이 뛰어나다고 생각할 수 있으며 PDGF군과 calcium

sulfate군과 비교시 유의차가 있음을 볼 때 PDGF투여시 치주인대세포의 증식이 유도되었으므로 calcium sulfate의 우수한 생체적합성에 비추어 보아 성장인자를 주입시 치주조직재생에 도움이 되는 vehicle로서 역할 가능성이 기대된다고 볼 수 있다.

Calcium sulfate 용출액을 이용한 MTT assay에 의한 세포증식도를 보면, 대조군과 실험군에서 1일, 2일, 3일 비교시 모두 감소한 것으로 비추어봐서 세포독성에 의해 나타난 결과에 기인한 것보다는 독성외적인 요인, 세포의 밀도, 배양액의 구성성분, 배양액의 교환 간격 등의 요인에 의해 빚어진 결과라 생각이 되어 좀 더 엄격한 실험조건과 지침을 만들어 수행하였으면 좋을 것이라 사료된다.

대조군과 calcium sulfate군과의 비교시 유의차가 없는 것으로 볼 때 calcium sulfate가 세포수 산정과 마찬가지로 생체적합성이 뛰어나다고 볼 수 있으며 PDGF군, calcium sulfate+PDGF군이 calcium sulfate군과의 비교시 유의차가 있는 것을 볼 때 PDGF가 치주인대세포의 활성을 촉진시키며 calcium sulfate가 vehicle로서의 역할가능성을 보여주고 있으며 PDGF군에서 세포의 증식이 증가하다 시간이 갈수록 정체되는 경향을 보이는데 이것은 PDGF가 초기에 유리가 되어 나타난 양상으로 서서히 유리시켜 활성을 지속시켜주는 vehicle이 필요하다고 본다.

Transwell을 이용한 MTT assay에서 세포증식도를 보면, 용출액을 이용한 실험이 간접적인 방법에 의해서 측정된 것이라면 transwell을 이용한 실험은 직접적인 방법에 의해서 calcium sulfate의 역할을 측정된 것으로 양 실험을 비교 검토하는 것은 임상적 적용에 앞서 calcium sulfate가 치주인대세포에 어떠한 영향을 주는지 살펴보는 것으로 중요한 의미를 지닌다고 볼 수 있다. 본 실험에서는 1일에서 대조군과 calcium sulfate군이 유의성 있는 차이가 있었는데 이러한 결과는 calcium

sulfate의 표면이 거칠고 오돌토돌하여 치주인대세포의 이주가 방해받을 바아서 나타난 결과라 생각되어지며 Payne등<sup>50)</sup>에 의한 실험과 일치한다. 따라서 임상적 적용시 최대한으로 표면을 부드럽게 조작하여 사용하는 것이 좋을 것이라 생각되어진다. 그러나 2, 3일에는 대조군과 calcium sulfate군이 차이가 없는 것으로 보아 생체적합성이 좋은 것으로 사료된다.

이상에서 고찰해 본 결과 세포수 산정과 마찬가지로의 결과를 얻었는데 이러한 결과로 미루어보아 시간이 오래걸리며 과정이 복잡한 세포수 산정에 의한 방법보다는 간단하고 많은양을 한번에 측정할 수 있는 MTT assay가 효과적이라 할 수 있다.

한편, 치주조직의 결합조직은 교원질, 비교원성 단백질, glycosaminoglycan과 소량의 elastin으로 구성되어 지는데 그 중 교원질이 주성분을 이루고 있으며 치주인대에는 특히 많은 비율로 존재한다.<sup>55)</sup> 치주인대에 존재하는 교원질의 형태는 Type I 이 94%이상의 많은 비율을 차지하고 있으므로,<sup>55)</sup> 본 실험에서는 Type I 형성을 측정하는데 주안점을 두고 있다.

결합조직의 구성성분, 특히 교원질의 합성은 질환에 이환된 부위의 치유과정 및 조직의 구조와 기능을 유지하는데 있어서 중요하다. 따라서 calcium sulfate가 치주인대세포의 교원질합성에 있어서 어떠한 영향을 미치는가 평가하는 것은 치주조직의 재생에 있어서 중요한 의미를 가진다고 볼 수 있다.

본 실험에서는 교원질의 합성능은 항원성 epitope와 반응하는 항체를 이용하여 단백질 혼합물에서 원하는 교원질(항원)을 찾아내는 immunoblotting assay 방법을 이용하였다. 분석하고자 하는 단백질을 함유하고 있는 세포를 용해시킨 후 교원질이 결합하고 있는 부분이 외의 결합부위는 inert 단백질과 detergent와 같은 blocking제제로 비특이성 결

합을 막음으로써 교원질 이외의 배경의 염색을 최소로 한 뒤 효소반응을 이용하여 2차항체에 연결되어 있는 horseradish peroxidase와 이 효소의 기질로써 o-phenylenediamine (OPD) 항원항체복합체를 ELISA reader로 여러 단백질중 원하는 교원질만을 측정하는 것이다.

본 실험에서는 calcium sulfate군이 1일과 2일에 낮게 나타났지만 3일에는 증가되는 양상을 띄고있고, 대조군과 비교시 1일과 2일에는 차이가 있지만 3일에는 차이가 줄어든 것으로 나타나서 독성에 의한 원인보다는 외부약제가 단위세포에 자극시 단위세포가 새로운 환경에 적응하여 본래의 세포의 기능을 회복하는 과정에서 나타난 결과라 생각되어서 생체 적합성이 있는 것으로 간주할 수 있다. calcium sulfate+PDGF군에서 1일에 높게 나타났는데 이것은 PDGF가 초기에 유리되어 나타난 결과라 생각되어서 calcium sulfate가 vehicle로서의 가능성을 보여준다고 할 수 있다.

본 실험에서 나타난 양상은 앞의 실험들과 약간 상이한 결과가 나타났는데 그 이유를 보면 본 실험에서 이용한 immunoblotting assay의 실험과정에서 나오는 오류 등과 한정된 data에 의한 통계학적인 신뢰성부족등을 들 수가 있다.

따라서 앞으로 교원질 합성의 다른 방법인  $^3\text{[H]}$ -proline assay와 Bio-rad protein assay 등의 사용을 고려해 볼만하며 protocol의 정확한 준수로 실험과정에서의 오류를 최소화하는 것이 바람직하다고 생각되어 진다.

한편 앞으로의 연구에서 몇가지의 고려사항을 도입해 볼 필요성이 제기되는데 첫째, 좀더 긴 간격의 시간 설정, Wikesjö<sup>6)</sup>은 전형적인 상처치유과정에서는 2-4일 경에 세포수가 증가하며 5일경부터 단백질합성이 시작되었다고 하였고, Lynch등<sup>36)</sup>은 PDGF반감기는 4.2시간이며 4일 후에는 약 4%만이 실험부위에 존재하며 2주 후에는 완전히 소실되나 이 기

간동안 PDGF가 존재하지 않더라도 일련의 상처 치유과정에 자극을 준다고 하였고, Wang등<sup>57)</sup>은 PDGF가 거의 소멸된 7일경에 세포의 증식이 원활하다고 보고하였다.

이렇게 볼 때 세포의 전형적인 성장양상인 "lag phase", "log phase", "plateau phase"의 단계가 명확하게 나타나서 정확한 분석이 일어날 수 있도록 하기 위해서는 약 10일 정도의 기간을 두어 실험을 진행한다면 본 실험에서 3일간의 기간을 두고 한 것보다 더 명확한 성장양상을 고찰해 볼 수 있지않을까 생각이 든다.

둘째, 치주인대세포의 유형인데, Matsuda등<sup>32)</sup>은 치주인대세포를 분리하는데 있어서 전통적인 치아를 발거 후 채취하는 방법대신에 치유과정중의 발치와 응고와에서 채취하였는데 상피세포의 가능한한 오염을 줄였고 가늘고 길며 극성양상의 외형을 지닌 증식능력이 있는 치주인대 세포들을 분리하면 실험시 상당한 잇점이 있었다고 보고하였으며 Blom등<sup>40)</sup>은 유전자형이 정상적으로 변형이 잘되기 때문에 세포의 배양시 주의하여야 실험결과가 다르게 나오지 않는다고 보고하는등 치주인대세포의 유형이 실험에 있어서 중요한 영향을 미치므로 세포의 배양시 좀더 다른 세포의 오염을 줄이고 무균적 처치를 하는 것이 도움을 줄 것이라고 생각되어 진다.

이상에서 볼 때 calcium sulfate가 세포활성에 미치는 영향을 좀 더 평가하기 위해서는, 본 실험에서 사용한 세포수 산정, MTT assay, 교원질합성능 이외에도 DNA 합성능, 국소적으로 인산이온농도를 증가시켜 세포기질에 calcium phosphate침착을 유도하여 광물화과정에 중요한 역할을 담당하는 alkaline phosphate 활성도등도 함께 연구되어야 할 것이라 생각되어지며 vehicle역할로서 사용할 때 PDGF와 상승작용이 있는 IGF-I 과 혼합사용, fibroblast growth factor(FGF), transforming growth factor(TGF- $\beta$ ), epidermal growth

factor(EGF), bone morphogenetic protein(BMP), fibronectin등의 사용시 치주조직재생에 어떠한 영향을 끼치는지 연구가 이루어져야 할 것이라 생각된다.

본 실험은 제한된 생물학적인 조건하에서 단지 한가지 종류의 단위세포(섬유아세포)를 대상으로 시행된 실험으로 실제 구강내와 조건이 많이 다르다. 즉 타액, 혈액, 조직삼출액 등과 혼합되면서 희석이 되고 숙주내의 면역 기능에 의해 평형상태가 유지되며 상처의 치유과정에 있어서 간엽조직, 혈관조직, 염증세포 등을 포함한 다양한 세포들이 복합적으로 상호관련성을 띄고 있으며 구강세균과 관련된 여러요소들이 치유작용을 방해하는 등 위의 실험결과와 동일한 영향을 미친다고 할 수 없으므로 임상적 적용을 위한 전단계의 과정의 실험이라 할 수 있다.

따라서 이런 인자들의 복합적으로 상호작용을 할 수 있는 포괄적인 환경에 의거한 model을 연구하여 in vitro와 in vivo가 동시에 이루어지고 나아가 임상실험을 통해 조각이 보다 간편하고 치유과정에 도움을 주는 calcium sulfate의 개발이 필요할 것이라 사료된다.

## V. 결론

생체 내 골이식재제와 흡수성 차단막재료로 사용할 수 있는 calcium sulfate가 치주인대세포에 미치는 영향과 세포의 성장, 형성기능을 조절하는 성장인자의 vehicle로서 사용가능성이 있는지를 알아보고자 치주인대세포를 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM에서 배양한 후  $\alpha$ -MEM에서 배양한 군을 대조군으로 하고 동일한 배지조건 하에서 calcium sulfate를 넣어서 배양한 군(calcium sulfate군), calcium sulfate에 15ng/ml 농도의 PDGF를 주입하여 배양한 군(calcium sulfate+PDGF군),  $\alpha$ -MEM에 15ng/ml 농도의 PDGF를 주입하여

배양한 군(PDGF군)을 실험군으로 하여 세포 배양 1, 2, 3일에 각군의 세포수 산정, MTT assay, 교원질 합성능을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포수 산정에 의한 세포증식에 있어서 calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF군은 대조군과 비교시 1, 2, 3일에 유의성 있는 차이가 없었고 PDGF군은 calcium sulfate군에 비해서 1, 2일에 유의성 있는 차이가 있었다( $P<0.05$ ).
2. 용출액을 이용한 MTT assay에 의한 세포증식에 있어서 calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF군은 대조군과 비교시 1, 2, 3일에 유의성 있는 차이가 없었고 PDGF군은 calcium sulfate군에 비해서 2-3일에 유의성 있는 차이가 있었으며 calcium sulfate+PDGF군은 calcium sulfate군에 비해 2일에 유의성 있는 차이가 있었다( $P<0.05$ ).
3. Transwell을 이용한 MTT assay에 의한 세포증식에 있어서 calcium sulfate군과 calcium sulfate+PDGF군은 대조군과 PDGF군과 비교시 1일에는 유의성 있는 차이가 있었으나 2, 3일에는 유의성 있는 차이가 없었다( $P<0.05$ ).
4. Immunoblotting assay에 의한 교원질합성능에 있어서 calcium sulfate군은 3일에, calcium sulfate+PDGF군은 1일에, PDGF군은 2일에 높게 나타났다.

이상의 결과에서 볼 때, calcium sulfate는 치주인대세포에 유해한 독성반응을 나타내지 않는 생체적합성이 입증되었으며, PDGF같은 성장인자의 주입시 vehicle의 역할 가능성을 보여주고 있으므로 치주조직 재생에 있어서 생체재료로서의 가치가 있음을 시사해주고 있다.

## VI. 참고문헌

1. Melcher, A. H.: On the repair potential of periodontal tissue, J. periodontol., 47:256, 1976.
2. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., Lindhe, J.: The regenerative potential of the periodontal ligament: An experimental study in the monkey, J. Clin. Periodontol., 9:257, 1982.
3. Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J., Platen, S.: Healing following implantation of periodontitis affected root into gingival connective tissue, J. Clin. Periodontol., 7:394, 1980.
4. Bahn, S. L.: Plaster: A bone substitute, Oral Surg., 21:672, 1966.
5. Calhoun, N. R., Greene, G. W., and Blackledge, G. T.: Effects of plaster of Paris implants on osteogenesis in the mandible of dogs, J. Dent. Res., 42:1244, 1963.
6. Weinmann, L. P., and Sicher, H.: Bone and Bones, Ed.2, St. Louis, C.V. Mosby Co., 1955.
7. Peltier, L. F.: The use of plaster of Paris to fill defects in bone, Ann. Surg., 146:61, 1957.
8. Radentz, W. H., and Collings, C. K.: The implantation of plaster of Paris in the alveolar process of the dog, J. Periodontol., 36:357, 1965.
9. Bell, W. H.: Resorption characteristics of bone and bone substitutes, Oral Surg., 17:650, 1964.
10. Shaffer, C. D., and App, G. R.: The use of plaster of Paris in treating infrabony periodontal defects in humans, J. Periodontol., 42:685, 1971.
11. Magnusson, I., Batich, C., Collins, B. R.: New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membrane, J. Periodontol., 59:1, 1988.
12. Galgut, P.N.: Oxidized cellulose mesh used as a biodegradable barrier membrane in the technique of guided tissue regeneration. A case report, J. Periodontol., 61:766, 1990.
13. Fleisher, H. Waal, H.D., Bloom, A.: Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicryl absorbable mesh(Polyglactin 910®), Int. J. Periodont. Resto. Dent., 8:45, 1988.
14. Blumenthal, N. M., Sabet, T. W., Barrington, E.: Healing response to grafting combined collagen-decalcified bone in periodontal wound healing, J. Periodontol., 57, 1986.
15. Pitaru, S., Tai, H., Soldinger, M., Grosskopf, A., Noff, M.: Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine, J. Periodontol., 59:380, 1988.
16. Pontoriero, R., Nyman, S., Ericsson, I., Lindhe, J.: Guided tissue regeneration in surgically produced furcation defects: An experimental study in the beagle dog, J. Clin. Periodontol., 19:159, 1992.
17. Selvig, K. A., Kersten, B. G., Wilkes, U. M. E.: Surgical treatment of intrabony periodontal defects using e-PTFE barrier membranes: Influence of defect configuration on healing response, J. Periodontol., 64:733, 1993.
18. Aukhil, I., Petersson, E., Sugges, C.: Guided tissue regeneration. An experimental procedures in beagle dogs,

- J. Periodontol., 57:72, 1986.
19. Becker, W., Becker, B. E.: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case reports, *Int. J. Periodont. Resto. Dent.*, 10:377, 1990.
20. Becker, W., Becker, B., Berg, L., Prichard, J., Caffesse, R., Rosenberg, E.: New attachment after treatment with root isolation procedures: reports for treated class III and II furcations and vertical osseous defects, *Int. J. Periodont. Resto. Dent.*, 3:2, 1988.
21. Selvig, K. A., Kersten, B. G., Chamberlain, A. D., Wikesjö U. M. E., Nilveus, R. E.: Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using e-PTFE barrier evaluation of retrieved membranes versus clinical healing, *J. Periodontol.*, 63:974, 1992.
22. Selvig, K. A., Nilveus, R. E., Fitzmorris, L., Kersten, B., Khorsandi, S. S.: Scanning electron microscopic observations of cell population and bacterial contamination of membranes used for guided periodontal tissue regeneration in humans, *J. Periodontol.*, 61:515, 1990.
23. Alderman, N. E.: Sterile plaster of Paris as an implant in the infrabony environment: a preliminary study, *J. Periodontol.*, 40:11, 1969.
24. Sottosanti, J. S.: Aesthetic extraction with calcium sulfate and the principle guided tissue regeneration, *Pract. Periodont & Aesthetic Dent.*, 5:62, 1993.
25. Anson, D.: Calcium sulfate: A 4-year observation of its use as a resorbable barrier in guided tissue regeneration of periodontal defects, *Compend. Comt. Ed.*, 17: 895, 1996.
26. Conner, H. D.: Bone grafting with a calcium sulfate barrier after root amputation, *Compend. Comt. Ed.*, 17:42, 1996.
27. Aukhil, I., Igihaut, I.: Periodontal ligament cell kinetics following experimental regenerative procedures, *J. Clin. Periodontol.*, 15:374, 1988.
28. Terranova, V. P., Wikesjö U. M. E.: Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium: A review, *J. Periodontol.*, 58:371, 1987.
29. Ross, R., Raines, E. W., Bowen-pope, D. F.: The biology of platelet- derived growth factor, *Cell.*, 46:155, 1986.
30. Williams, L. T.: Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor, *Science.*, 243:1564, 1987.
31. Canalis, E.: Effect of platelet-derived growth factors on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, *Metabolism.*, 30:970, 1981.
32. Matsuda, N., Lin, W. L., Kumar, N. M., Cho, M. I., Genco, R. J.: Mitogenic chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, *J. Periodontol.*, 63:515, 1992.
33. Oates, T. W., Rouse, C. A., Cochran, D. L.: Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro, *J. Periodontol.*, 64:142, 1993.
34. Lynch, S. E., Williams, R. C., Polson, A. M., Howell, T. H., Ready, M. S.: A combination of platelet-derived and



- insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration, *J. Clin. Periodontol.*, 16:545, 1989.
35. Lynch, S. E., Buser, D., Hernandez, R. A., Weber, H. P., Stich, H., Fox, C. H.: Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor- I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs, *J. Periodontol.*, 62:710, 1991.
  36. Lynch, S. E., Castilla, G. R., Williams, R. C., Kiritsh, C. P., Howell, T. H.: The effects of short-term applicaion of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing, *J. Periodontol.*, 62:458, 1991.
  37. Rutherford, R. B., Niekrash, C. E., Kennedy, J. E., Charette, M. F.: Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys, *J. Periodont. Res.*, 27:285, 1992.
  38. Becker, W., Lynch, S. E., Lekholm, U., Becker, B. E., Caffesse, R.: A comparison of ePTEE membrane alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-1 or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants, *J. Periodontol.*, 63:929, 1992.
  39. Bartold, P. M., Narayana, A. S., Page, R. C.: Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation, *J. Periodont. Res.*, 27:499, 1992.
  40. Blom, S., Holmstrup, P., Dabelsteen, E.: The effect of insulin-like growth factor-I and human growth hormone on periodontal ligament fibroblast morphology, growth pattern, DNA synthesis, and receptor binding, *J. Periodontol.*, 63:960, 1992.
  41. Blom, S., Holmstrup, P., Dabelsteen, E.: A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cell's DNA synthesis and morphology, *J. Periodontol.*, 65:373, 1994.
  42. Rutherford, R. B., Ryan, M. E., Kennedy, J. E., Tucker, M. M., Charette, M. F.: Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys, *J. Clin. Periodontol.*, 20:537, 1993.
  43. Sigurdsson, T., Lee, M. B., Kubota, K., Turek, T. J., Wozney, J. M., Wikesjö U.M.E.: Periodontal repair in dogs: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration, *J. Periodontol.*, 66:131, 1994.
  44. Yamazaki, A., Oida, S., and Akimoo, Y.: Response of mouse femoral muscle to an implant of a composite of morphogenetic protein and plaster of Paris, *Clin. Orthop.*, 234:240, 1988.
  45. Sottosanti, J. S.: Calcium sulfate: A biodegradable and biocompatible barrier for guided tissue regeneration, *Compend. Cont. Ed.*, 13:226, 1992.
  46. Sottosanti, J. S.: Calcium sulfate is a safe, resorbable barrier adjunct to

- implant surgical procedures, *Dental Implantology Update*, 4:69, 1993.
47. Simion, M., Baldoni, M., Rossi, P., Zaffe, D. A.: Comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period, *Int. J. Periodont. Resto. Dent.*, 14:167, 1994.
  48. Brunette, D. M.: The effects of implant surface topography on the behavior of cells, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 3:231, 1988.
  49. Salonen, J. I., Persson, R. G.: Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration, *J. Periodont. Res.*, 25:115, 1990.
  50. Payne, J. M., Cobb, C. M., Rapley, J. W., Killoy, W. J., Spencer, P.: Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials, *J. Periodontol.*, 67:236, 1996.
  51. Rutherford, R. B., Trailsmith, M. D., Ryan, M. E., Charette, M. F.: Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factor mitogenesis in vitro, *Arch. Oral Biol.*, 37:139, 1992.
  52. Dennison, D. K., Vallone, D. R., Pinero, G. J., Rittman, B., Caffesse, R. G.: Differential effect of TGF- $\beta$ 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts, *J. Periodontol.*, 65:641, 1994.
  53. Freshney, R. I.: *Culture of Animal cells*, 3rd ed, Wiley-liss, Inc., 1994.
  54. Wataha, J. C., Craig, R. G., and Hanks C. T.: Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity, *Dent. Mater.*, 8:65, 1993
  55. Mariotti, M.: The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues, *Periodontol.* 2000., 3: 39, 1993.
  56. Wikesjö U. M. E., Nilveus, R. E., Selvig, K. A.: Significance of early healing events in periodontal repair: a review, *J. Periodontol.*, 63:158, 1992.
  57. Wang, H. L., Pappert, T. D., Castelli, W. A., Chego D. J., Smith B. A.: The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: An autoradiographic study on dogs, *J. Periodontol.*, 65:429, 1994.

## The effects of a combination of calcium sulfate and platelet-derived growth factor on periodontal ligament cells in vitro

Jun-Seong Kim\*, Seong-Ho Choi\*, Yun-Jung Yu\*\*, Jung-Kiu Chai\*,  
Chong-Kwan Kim\*, Kyoo-Sung Cho\*,

Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University  
Research Institute for Periodontal Regeneration\*

Department of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University\*\*

It was well known that calcium sulfate was biocompatible, resorbed rapidly in the body, had potential as a good barrier membrane. Platelet-derived growth factor(PDGF) was one of polypeptide growth factor that had been reported as a biological mediator which regulates activities of wound healing process including the cell proliferation, migration and metabolism.

The purpose of this study was to evaluate the effects of a combination of calcium sulfate and PDGF on periodontal ligament cells in vitro to use as a regeneration promoting agent of periodontal tissue. Human periodontal ligament cells were prepared from the premolar tooth extracted for the orthodontic treatment. Cells were cultured in  $\alpha$ -MEM contained with 20% FBS, at the 37°C, 100% of humidity, 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were inoculated and cultured into 96 well culture plate with  $1 \times 10^4$  cells/well of  $\alpha$ -MEM for 1 day.

After discarding the medium, those cells were cultured in  $\alpha$ -MEM contained with 10% FBS alone(control group), in calcium sulfate(calcium sulfate group), in calcium sulfate treated with 15ng/ml of PDGF-BB(calcium sulfate+PDGF group), in  $\alpha$ -MEM contained with 10% FBS treated with 15ng/ml of PDGF-BB(PDGF group) for 1, 2, 3 day respectively. And then each group was characterized by examining of the cell counting, MTT assay, collagen synthesis.

The results were as follows.

1. In the analysis of cell proliferation by cell counting, both calcium sulfate group and calcium sulfate plus PDGF group showed no statically significant difference compared to control group, but there was statically significant difference between PDGF group and calcium sulfate group at 1, 2 day( $P < 0.05$ ).
2. In the analysis of cell proliferation by MTT assay in calcium sulfate extracts, both calcium sulfate group and calcium sulfate plus PDGF group showed no statically significant difference compared to control group, but there was statically significant difference between PDGF group and calcium sulfate group at 2, 3 day, and between calcium sulfate plus

PDGF group and calcium sulfate group at 2 day( $P<0.05$ ).

3. In the analysis of cell proliferation by MTT assay in transwell, both control group and PDGF group showed stastically significant difference compared to both calcium sulfate group and calcium sulfate plus PDGF group at 1 day, but there was no stastically significant difference compared to both calcium sulfate group and calcium sulfate plus PDGF group at 2, 3 day( $P<0.05$ ).
4. In the analysis of collagen synthesis by immunoblotting assay in calcium sulfate extracts, high level was detected on calcium sulfate group at 3 day, on calcium sulfate plus PDGF group at 1 day, on PDGF group at 2 day.

On the basis of these results, calcium sulfate was biocompatible on the periodontal ligament cells and might have potential possibility as a vehicle of PDGF in the periodontal tissue regeneration.

---

Key words: calcium sulfate, platelet-derived growth factor(PDGF) biocompatible, vehicle, periodontal tissue regeneration.