

불멸화된 치은 섬유아 세포주의 확립

송제봉¹ · 김현아¹ · 현하나¹ · 김은철² · 유형근¹ · 신형식¹

원광대학교 치과대학 치주과학교실¹, 구강병리학교실²

I. 서론

치주질환이 중증으로 진행되면 치주인대의 파괴는 물론 치조골의 흡수와 치아의 동요가 심화되고 궁극적으로 치아의 상실을 초래하게 된다. 따라서 치주치료의 주된 목적은 질환의 진행을 중지시키고 파괴된 치조골을 회복시키며 치아와 치조골 사이의 부착을 재생시키는데 있다. 일반적으로 치주치료에 따른 치유과정은 시술 후 초기단계에서는 결손부 주위로 섬유아세포가 이주하고 증식하며, 이들 세포에서 교원섬유와 기질이 합성되는 동시에 신생 백악질 형성으로 치근면과 재생골에 교원섬유가 함입하여 신부착이 형성됨을 의미한다¹⁾.

치주조직의 재생에 관여하는 주된 세포로는 치은 상피세포, 치은결체조직세포, 치조골 세포, 치주인대 세포 등이 있고 이들 중 치은섬유아세포가 조직재생에 주로 관여한다는 주장도 있으나,²⁾ 대부분의 학자들³⁻⁷⁾은 치주인대에서 유래된 세포가 질환으로 손상된 조직의 재생에 주로 관여한다고 주장하였다. 이와는 달리 치은은 치은섬유에 의해 치아와 부착되고 외부로부터의 발병요인 및 저작력에 저항하는 기능이 있으며, 정상적인 치은은 주로 교원질, 당단백, 비교원질성 단백질로 구성되어 있고 이중 섬유아세포

가 전체 세포 중 60-70%를 차지하며 교원질 및 간질의 형성에 기여한다^{1, 26)}.

생체실험과 병행하여 치유과정에 관여하는 세포들의 성상을 규명하기 위해 Arnold와 Baram¹¹⁾은 치주인대세포의 배양에 처음으로 성공한 이래, 치주인대내의 상피세포와 섬유아세포를 세포배양하여¹²⁻¹⁷⁾ 연구가 진행되어 왔고, 최근에는 치은섬유아세포와 치주인대세포의 특성에 대해 그 중요성의 인식과 더불어 이에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있지만 치주인대 세포나 치은 섬유아세포의 형태 및 성장특성 등에 대해 학자들간에 서로 상이한 견해를 보여 아직 명확히 규명되어 있지 못한 실정이다.

치주인대를 비롯한 섬유아세포는 실험실 배양시 계속 분열할 수 있는 제한된 능력과 정해진 수명을 갖고 있어 정상적인 세포일지라도 생체의 연속 배양 함됨에 따라 세포성, 생리학적, 생화학적, 분자적 변화가 나타난다. 이러한 변화의 대부분이 진행성 및 축적적이어서 결국 세포증식의 비가역적 종말인 세포사에 이르게 되며, 이러한 변화와 관련된 세포노화에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다^{37, 38)}.

또한 동일한 조직을 사용한 일차배양(primary culture)에서도 다양한 성장 fraction을 보이며 세포들간의 표현형은 서로 다를 수 있는데, 특히 치주인대세

*이 논문은 2001년도 원광대학교 송산연구비 지원에 의해서 수행됨.

포의 경우 이중성을 가져 생체의실험시 다양한 증식 단계에서 미분화 간엽세포, 조섬유세포, 조골세포, 파골세포, 조백악세포 등을 포함하고 있어 세포군의 이중성이나 노화 때문에 생체의 실험에서 얻어진 결과를 이해하기 어렵게 하였다^{45, 46}.

반면에 세포주를 이용한 연구는 세포를 충분히 얻을 수 있고, 같은 실험을 반복할 수 있으며, 살아있는 상태에서의 세포내 대사작용을 연구할 수 있을 뿐만 아니라, 체내에서 불가능한 여러가지 조작이 가능하다는 장점이 있다⁴¹.

이러한 관점에서 단일 clone에서 기원하면서 노화되지 않은 세포주의 확립 연구가 세포의 생리학적 기능을 밝히는데 필수적 이라고 생각되는데 일차배양한 정상 섬유아세포의 세포주확립에 관한 연구로는 1997년 인간 폐섬유아세포를 HPV16 E6/E7으로 불멸화시켰고⁵⁴), 2001년 인간 심장 섬유아세포를 HPV16 E6/E7으로 불멸화시켰다⁵⁵). 치주조직으로는 1996년 Tasaka가 생쥐의 치주인대세포를 불멸화시킨 세포주를 처음 개발하였으며,³⁹) 1997년 Carlnes 등이 인간의 치주인대세포를 SV-40 T antigen cDNA로 처음으로 불멸화시켰으나⁴⁰), 이후 이와 관련된 연

구는 매우 드물어 국내에서도 치주조직의 세포주 개발이 필요하다고 생각되었다.

본 연구의 목적은 치주조직 세포주 확립의 1단계로 치주조직중 치은 섬유아세포를 HPV 16으로 불멸화시켜 30계대 이상 확립시킨 후 세포의 세포형태와 증식, 분화양상을 분석하여 그 예비 결과를 보고함으로서, 치은 섬유아세포의 단일 클론세포의 개발을 통해 향후 연구의 기초 자료를 제공하고 생체내 조건과 유사한 배양 환경을 제공할 수 있는 삼차원적 세포 배양법에 이용되어 다양한 세포의 기질과 결합조직 세포와의 상호관계 연구에 도움을 주기 위해 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포의 배양

치은섬유아세포의 배양을 위하여 채취한 치은조직을 배지에 3회 세척하고 배양접시에 넣은 후 1×1×1mm 크기로 세절하여 세절된 조직편 8~10개를 100mm크기의 세포배양용 접시에 10% Fetal Bovine

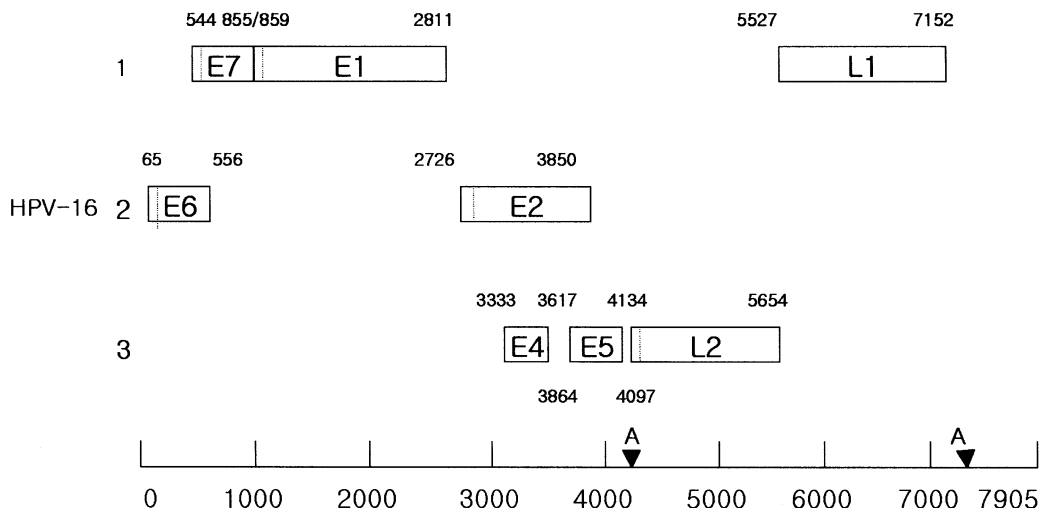


Figure 1. Genomic structure of HPV type 16. Note the conserved general organization and presence of the early region with 7 open reading frames(ORF), the late region with 2 ORFs and the unique long control region(LCR) lying between nt 7000 and 7900.

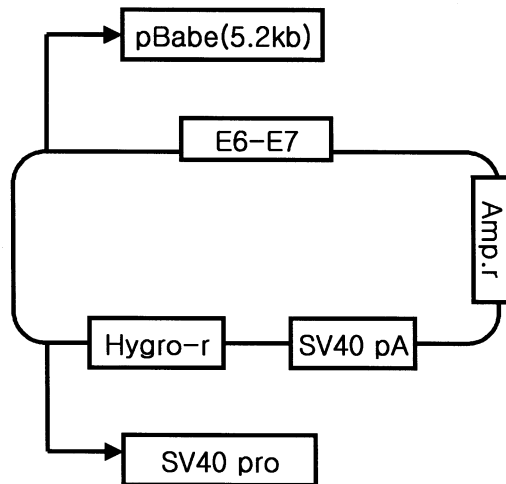


Figure 2. Schematic representation of plasmid construction. pBabe is a vector plasmid. E6E7 is inducible expression plasmid that express HPV-16 E6-E7. Amp^r: ampicillin resistance genes, SV40 pro: SV40 early enhancer/promotor, SV40 pA: SV40 polyadenylation signal, Hygro-r: Hygromycin resistance gene.

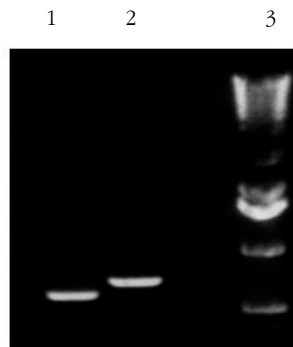


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of HPV-16 DNA. (Lane 1: pBaBe vector(5.2kb), Lane 2: HPV-16 E6/E7 ligated vector, Lane 3: Hind III marker)

Serum(FBS, Gibco/BRL, Grand Island, NY, U.S.A)과 100unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고, 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 치은 섬유아세포가 조직절편으로부터 증식되어 완전히 배양접시를 피개하는 단층이 형성된 후 100mm 세포 배양용 접시를 이용하여 계대배양하였다.

본 실험에서는 성장 특성을 명확히 비교하기 위하여 동일 환자, 동일 세대의 세포를 이용하였으며 5세대 이상의 세포는 사용하지 않았다.

2. 치은섬유아세포에 HPV16의 transfection; immortalized clonal selection

HPV16 genome의 full length를 포함하고 있는 pBR322로부터 E6와 E7의 full length(약 700bp)를 클론화 하여 hygromycin B 저항성이 있는 pBabe vector의 BamHI과 Sal I 부위에 삽입한 후 pBabe HPV 16 E6/E7 plasmid DNA를 gel purify하고 에탄올 침전, 정량화와 함께 BamHI과 Sal I으로 확인하였다(Figure 2). Transfection 전에 G418 저항성이 있는 peak 8 GFP(green fluorescent protein)을 일차 배

양한 치은 섬유아세포에 transfection하여 효율을 검사한 후, Lipofectamine plus kit(Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 제조회사의 추천에 따라 60mm dish의 치은 섬유아세포가 70-80%의 성장에 도달했을 때 pBabe E6/E7과 음성대조군으로 pBabe vector만을 transfection 하였다. 2일후 세포에 10 µg/ml의 hygromycin(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 2주간 untransfected 대조군 세포가 죽을때까지 처리하여, hygromycin resistant colony를 클론화하고 30 계대 배양을 한 후 실험에 이용하였다.

3. 광학현미경적 관찰

모든 실험에서 약 1주 간격으로 지속적으로 계대 배양 하였는데 계대시는 배양접시를 0.25% Trypsin EDTA로 처리하여 세포를 분리하고 혈구계수기를 이용하여 세포 수를 산정하고 4개의 배양접시로 옮겨 배양하였다. 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus BH-S, Olympus, Japan)으로 관찰하여 성장 특성과 세포의 형태학적 특성을 기록하였다.

4. 세포성장검사

세포성장검사는 지속적으로 계대배양을 한 후 4차 배양에서 60mm 배양접시에 각각 10×10^5 의 세포를 넣은 후 1일 간격으로 10일간 4개씩의 배양접시를 다시 Trypsin EDTA용액으로 처리하여 세포 수를 측정하고 doubling time을 산정 하였다. doubling time의 산정은 다음과 같은 공식(1)에 의해 계산하였다.

5. 세포활성도 측정

계대 배양된 GF와 IGF 세포를 0.25% Trypsin/

EDTA로 떼어내어 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 각 well당 1×10^4 개의 세포가 들어갈도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO₂, 100% 습도의 37°C 배양기에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 교환하고 각각의 시간이 경과된 후 생리 식염수로 용해한 MTT (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide ; No. M2128, Sigma Chemical Co. USA) 용액 300 µl씩을 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200 µl의 DMSO (dimethyl sulfoxide; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 세포활성도를 보기 위해 96-well plate 상으로 옮겨서 ELISA analyser (Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 통계분석

치은 섬유아세포(GF)와 불멸화된 치은섬유아세포(IGF) 간의 성장 차이를 1, 3, 5일간 알아보기 위하여 MTT값과 성장곡선을 t-test 로 실험결과에 유의성이 있는지 유의수준 0.01에서 통계학적으로 검증하였다.

7. IGF에서 RT-PCR을 이용한 HPV 16의 검출

치은 섬유아세포(GF)와 불멸화된 치은섬유아세포(IGF) 간의 HPV16 검출유무를 확인하기 위하여 Tri-reagent 용액 (Molecular Research Center, Inc., USA)을 이용하여 세포 RNA를 추출한 후 5'; GAC CCG GAA AGT TAC CAC AGT TA, 5'; TGG TTT CTG ACA GAT GGG GCA CAG A를 이용하였고, PCR 조건은 55°C에 30분간 반응시키고, 10 cycle은 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 68°C에서 45초로 반응시킨 후 30 cycle은 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 68°C

$$\text{population doubling time} = \frac{\text{LogM10(count at harvest)} - \text{Log10(cell count at inoclation)}}{0.301} \dots \text{공식(1)}$$

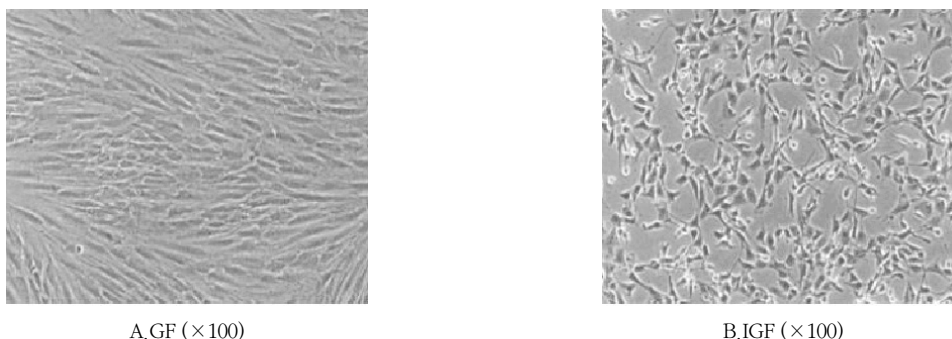


Figure 4. Phase-contrast photomicrographs showing morphological alterations. A Gingival fibroblasts are elongated and fusiform; B : Immortalized gingival fibroblasts are slightly cuboidal with orange grains-like appearance. Original magnification X100.

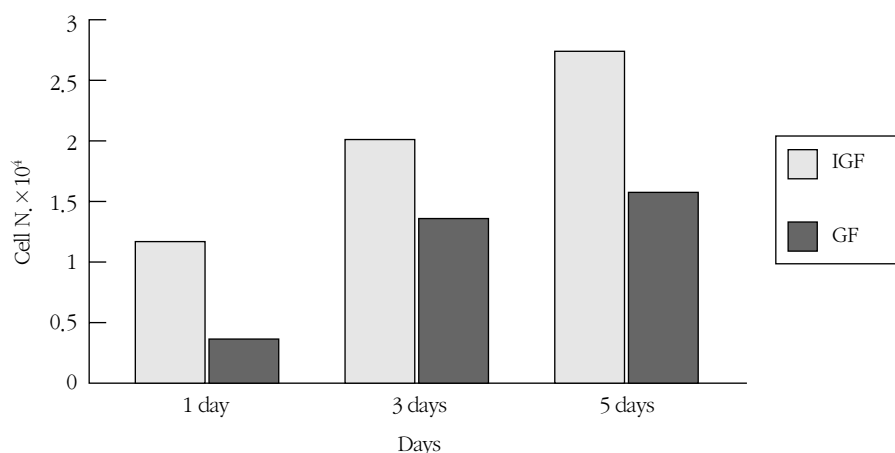


Figure 5. Cell growth curve for GF and IGF

Table 1. Cell viability in each experimental group after 1, 3, 5 days incubation. (Mean±S.D)(n=4)

	GF	IGF
1 day	0.441±.004	0.754±.051*
3 day	2.136±.093	2.784±.064*
5 days	3.139±.035	3.566±0.25*

* ; p<0.01

에서 90초로 RT-PCR kit(Gibco/BRL, Grand Island, NY, U.S.A)를 이용하였다.

III. 연구 결과

1. 세포의 형태

치은섬유아세포의 형태는 방추형 또는 전형적인 섬유아세포와 유사한 양상인 신장된 방추형을 나타냈으며 모두 일정한 방향으로 성장을 하였다. 그러나 IGF 세포는 초기 계대에는 방추형을 나타냈으나 20계대 이후로 성장형 또는 오렌지 알갱이 형태를 보였다(Figure 4).

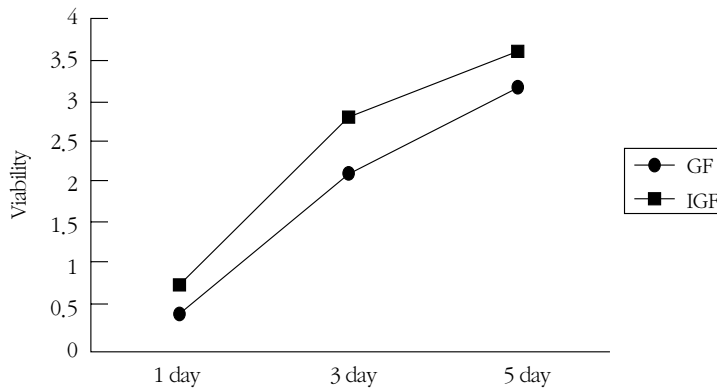


Figure 6. Cell viability for GF & IGF according to culture days

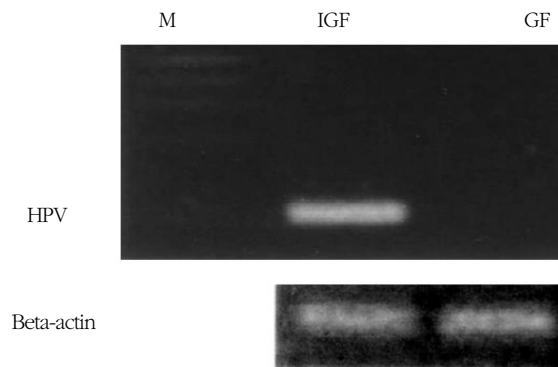


Figure 7. Detection of HPV16 E6/E7 Gene by RT-PCR

2. 세포성장검사

Doubling time에서 불멸화된 치은 섬유아세포는 1.47 day, 치은 섬유아세포는 2.37 day로 IGF 세포가 성장이 빨랐으며 Figure 5와 같다.

3. 세포 증식 측정

불멸화가 치은 섬유아세포 증식에 영향을 관찰하기 위하여 배양중인 치은 섬유아세포와 불멸화된 IGF 세포를 1, 3, 5일간 배양한 후 배양된 세포 수를 측정한 결과, IGF 세포의 1, 3, 5일군 모두에서 GF 세포군에 비하여 세포증식이 증가하는 양상을 나타내었다. 1일군에서는 70.9%, 3일군에서는 31%, 5일군에서는 14% 세포증식이 증가하였으며 1일군에서 최대 증식효과를 나타내었다 (Table 1, Figure 6).

IV. 총괄 및 고찰

세포불멸화는 아직까지는 생체외에서만 발견되며 정상적으로 성인체세포의 정상적으로 제한된 생명주기(senecence)에서 벗어났을 때 세포배양조건하에서 무한 증식하는 세포의 능력을 말한다. 인간세포의 불멸화는 현재 simian virus 40, adenovirus type 5 및 12, Human papilloma virus 16, 18, 22 또는 화학적 생리적 물질을 가해 불멸화시키는 것만이 재현 가능하다고 보고되었다^{35, 36}. 이러한 불멸화된 인간세포는 형태학적 변화, 염색체이상, 무제한 성장 잠재력이 인체의 암을 제외하고는 어느세포에서도 발견되지 않는 특징을 보인다³⁵.

HPV는 상피에 감염되는 작은 DNA virus로 인간 및 다른 동물에서 다양한 증식성 병소를 유도하는데,

인간 유두종바이러스에는 70여종 이상이 확인되었으며, 이중 HPV16과 18이 자궁경부를 비롯한 성기병소의 암조직에서 90%정도 발견이 되고⁴²⁻⁴⁴⁾, 구강내 양성 상피성 과증식의 발생도 HPV 감염과 밀접한 관련을 갖는데 구강암 조직의 40%정도에서 HPV가 검출되었다⁴⁴⁾.

구강정상각화상피에 관한 연구는 미국 UCLA 대학의 박동이 1991년 NHOK에 HPV16, 18로 불멸화시킨 IHOK세포주만을 처음으로 개발한 이래 정상상피와 최종분화연구에 비교 이용하고 있고⁴⁷⁾, 국내에서는 현재 구강 암종세포주의 확립에 연구의 중점을 두고 있으며 본연구에서 추구하고자 하는 여러 가지 치주조직세포의 세포주로서의 확립 연구는 국내에서 및 미국을 비롯한 외국에서도 아직 많이 이루어져 있지 않다.

정상적인 기능을 수행중인 치주인대내에서의 세포증식, 분화 및 활성도를 조절하는 인자에 관해서는 거의 알려진 바가 없고 특히 파괴된 조직의 재생에 관여하는 이런 세포들의 표현형이나 대사활성도에 관한 정보는 더욱 알려진 바가 없다. 조직치유에 있어서 상피세포보다는 섬유아세포의 역할이 큰 것으로 밝혀져 치주조직 세포중에서 일차로 치은섬유아세포들의 세포주확립을 연구하였다.

생체조직내에는 치주인대세포만 단독으로 존재하는 것이 아니라 여러 종류의 세포가 함께 존재하고, 특히 치주조직의 치유과정에 있어서 치은결합조직으로부터 기원하는 치은 섬유아세포가 결손부대로 먼저 증식하여 들어감으로서 치주조직의 신부착 및 재생을 방해하게 된다. 치주인대세포와 치은 섬유아세포는 치주조직의 재생에 있어 밀접한 관계를 가지고 있기 때문에, 치주조직의 재생과정을 이해하는데 있어서 단위세포만의 반응을 관찰하기 보다 향후 이 종성세포를 갖고 있는 치주인대 세포에서도 세포주 확립이 도움이 되리라 생각한다.

상피세포와 치은 결합조직이 치근면과 접촉하거나 이주하는 것을 방지하고자 시도된 임상연구²⁷⁻³¹⁾에서 나타난 바 치은 결합조직 세포는 치아의 재부착을 촉진시키지 못하고 광범위한 치근흡수를 야기시키는 반면 치주인대 유래 세포는 치근표면에 결집

되어 백악질에 새로운 결합조직섬유가 매몰되어 생기는 재부착을 가능하게 하였다는 사실로 미루어 보아 치주인대 결합조직 세포와 치은 결합조직 세포 사이에는 특성의 차이가 있을 것으로 추정된다.

또한 생체내에는 치주인대세포 단독으로 존재하는 것이 아니라 다른 세포들과 상존하기 때문에 세포간의 상호작용으로 그 양상이 다르게 나타날 것이다. Jacobsen과 Goldhaber³⁴⁾는 실험실적 실험에서 사람의 치은에서 얻어진 상피와 결합조직이 골흡수를 일으키며, 치은구성세포가 골흡수 활성인자를 분비한다고 하였는데 각 세포주확립 후 이에 대한 골대사와 관련된 연구도 보완해야 한다고 사료된다.

Piche¹⁸⁻²⁰⁾는 치은섬유아세포, 치주인대세포, 치조골세포를 대상으로 각 세포의 형태, 성장특성 및 생화화학적 차이를 연구한 바 있으며, Somerman²¹⁾은 치은섬유아세포와 치주인대세포의 특성을 명확히 규명해 보고자 동일 환자, 동일 세대의 세포를 사용하여 증식속도와 배양세포의 접촉억제현상을 규명하였고, Nanba²²⁾도 치은섬유아세포와 치주인대세포의 접촉억제효과에 대해 연구하였으며, Mariotti와 Cochran²³⁾, Nojima²⁴⁾는 두세포의 증식속도에 대한 연구 결과를 보고하였다.

그러나 이러한 생체실험에서는 재생에 관계되는 특정세포나 일련의 순서, 생화화학적 매개체에 관하여 정확히 규명하기가 어려웠다. 이러한 생체실험과 병행하여 세포의 성상을 규명하기 위한 시험관적인 연구가 많이 진행되어, Arnold와 Baram¹¹⁾은 치주인대세포를 시험관적 배양에 최초로 성공하였고, Marmay¹²⁾은 치주인대세포와 피부섬유아세포에 관해 연구하였으며, Brunette^{13,14)}, Blomlof와 Otteskog¹⁶⁾, Ragnarsson¹⁷⁾은 치주인대내에 존재하는 상피세포와 섬유아세포를 비교연구한 바있다.

본 실험에서 나타난 형태변화에 관한 결과를 분석하면 GF 세포에서, 세포가 배양접시를 불완전 피개한 상태에서는 일정한 주행방향을 가지면서 특징적인 섬유아세포의 양상인 신장된 방추형을 보였고 일반적으로 규칙적인 타원형의 핵이 관찰되었다. 세포들이 점차 증식되어 배양접시를 완전 피개한 상태에서는 일정한 방향으로 주행하던 세포군들이 서로 교

차되면서 일부에서 증충을 형성하기 시작하며 시간이 경과할수록 교차현상을 보이는 군들이 증가하여 불규칙한 주행방향을 가지는 것처럼 보였다.

IGF 세포의 형태는 GF 세포와 많은 차이를 나타냈는데, 상피세포와 유사하게 약간 cuboidal한 양상을 보이며 전반적인 양상은 오렌지 알갱이 모양으로 불규칙하게 주행하며 연결된 양상을 나타냈다.

GF와 IGF 세포 간의 증식양상을 비교해 보면 치은 섬유아세포군보다 IGF가 보다 훨씬 더 증식속도가 빨랐다. 이러한 이유는 HPV16의 E6 단백질이 p53과 결합해 이를 파괴하고, E7단백은 pRB를 불활성화시켜 세포가 세포주기중 S합성기로 계속 진행할 수가 있기 때문으로 여겨진다.

정상 피부 각화세포에서도 HPV16 E6와 E7 단백질로 불멸화시켰고^{48, 49)}, HPV-16 E6 단독으로는 인간 유선상피세포를 불멸화시킬수 있으나 E7 단독만으로는 할수 없다고 보고하였는데⁵⁰⁾, Watanabe⁵¹⁾ 등은 HPV16 E6와 E7이 정상 인간 섬유아세포의 생명 연장에 필요하지만 E6와 E7 유전자를 Simian Virus40 promotor를 이용했기 때문에 불멸화시킬수 없었다⁵¹⁾. 최근 Shay⁵²⁾ 등은 HPV-16 E6와 E7으로 인간 폐섬유모세포를 불멸화시킬수 있다고 하였다. 정상 체세포처럼 정상 인간 섬유아세포도 제한된 증식능을 갖고 있기 때문에 일정한 세포 분열후에는 노화가 되며 설치류 섬유아세포는 배양시 많은 빈도로 저절로 불멸화되기도 하지만 정상인간섬유아세포의 자연적 불멸화는 극히 드문일이라고 하였다⁵³⁾.

또 2배 증식 시간을 비교해 보면 IGF가 1.47일, GF는 2.37일로 GF에서 훨씬 빨랐다. 2배증식시간 연구에서 Nojima²⁴⁾에 따르면 치은섬유아세포는 38.4시간, 치주인대세포는 43.2시간으로, Piche²⁰⁾에 따르면 치조골세포 및 그와 유사한 치주인대세포는 1.6일, 치은섬유아세포 및 그와 유사한 치주인대세포는 3.2일로 보고했다. Auf mkolk³²⁾의 실험에서는 골세포는 120시간, 섬유아세포는 48시간이었으며, Wergedal과 Baylink³³⁾의 실험에서는 골세포가 평균 104시간이었으며 4-10일 사이의 변화가 있었다.

세포활성도에서는 IGF의 1, 3, 5일군 모두에서 GF 군에 비하여 세포증식이 증가하는 양상을 나타내었

다. 1일군에서는 70.9%, 3일군에서는 31%, 5일군에서는 14% 세포증식이 증가하였으며 1일군에서 최대 증식효과를 나타내었다. 따라서 일차배양의 단점인 증식속도가 낮아 대량으로 세포를 이용하기가 어려운 점을 개선 할 수 있으며, 전반적으로 세포 활성도가 증가되어 성장이 빨라 향후 삼차원적 배양이나 상피간엽분화연구에 쉽게 이용 가능하리라고 생각 된다.

IGF 세포주의 형태변화 및 증식에 관한 실험결과를 종합해 보면 저자는 치주조직 세포주 확립의 1단계로 치주조직중 치은 섬유아세포를 Human Papilloma Virus 16으로 불멸화시켜 30세대 이상 확립시켰으며 이와 같은 불멸화된 치은 섬유아세포의 단일 클론세포 개발을 통해 그 생물학적, 유전적 특성을 파악함으로써 여러 가지 세포외 기질과 결합조직 세포와의 상호관계 연구와 상피간엽세포의 증식과 분화연구에 이용할 수 있으리라 여겨진다.

V. 결론

치주조직의 재생에 관계하는 치주조직 세포주 확립의 1 단계로 치주세포중 치은 섬유아세포를 Human Papilloma Virus-16으로 불멸화시키고 30세대 이상 배양하여 세포주를 확립한후 세포의 세포형태와 성장, 증식양상을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 불멸화 치은 섬유아 세포는 정상 치은 섬유아 세포와는 형태학적으로 차이를 보여 오렌지 알갱이 모양의 형태를 보였다.
2. 세포증식의 평가에서 정상 치은섬유아세포의 doubling time은 2.37일, 불멸화된 치은 섬유아 세포는 1.47일로 세포성장 속도에 차이가 있었으며 결국 불멸화된 치은 섬유아 세포 주의 증식은 1, 3, 5일군 모두에서 정상 치은 섬유아세포 군에 비해 증가하였다.

이상과 같은 예비실험을 통해 치은 섬유아 세포주 확립을 위한 기본적인 단계는 이룬 것으로 여겨지며,

앞으로 정상 치은 섬유아세포와 불멸화 섬유아 세포 주 간의 특징적인 차이점을 밝혀내야 할 필요가 있다. 그리고 치주조직의 세포주들을 완전히 확립하게 되면 이들 세포의 대량 생산이 가능해져 세포 자체의 특징 분석 뿐만 아니라 세포 외 기질 및 결합 조직 세포와의 상호 관계 연구와 임상적으로 상피 간엽 세포와의 혼합 배양 연구 등에 이용할 수 있으리라 여겨진다.

VI. 참고문헌

1. Naraynan AS, Nakae H, Miki Y. Biology of the gingiva : The connective tissue in health and disease and molecular aspects of periodontal regeneration and reattachment. Recent Advances in Clinical Periodontology. Elsevier Science Publishers 51-61, 1988.
2. Bowers GM, Schallhorn RG, Mellonig JT. Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defect. A literature review. J Periodontol 53: 509-514, 1982.
3. Melcher AH. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. Achs Oral Biol 15: 1183-1204, 1970.
4. Melcher Ah. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol 47: 256-260, 1976.
5. Boyko GA, Melcher AH, Brunette DM. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. J Periodontol Res 16: 73-88, 1981.
6. Polson AM, Caton J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. J Periodontol 53: 617-625, 1982.
7. Isidor F, Karring T, Nyman S, Lindhe J. The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. J Periodontol 13: 145-150, 1986.
8. Gould TRL, Melcher AH, Brunette DM. Migration and division for progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. J Periodont Res 15: 20-42, 1980.
9. Gould TRL. Ultrastructural characteristics of progenitor cell populations in the periodontal ligament. J Dent Res 62: 873-876, 1983.
10. McCulloch CAG. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. Anat Rec 211: 258-262, 1985.
11. Arnold LF, Baram P. In vitro culture of periodontal ligament cells. J Dent Res 51:953-959, 1972.
12. Marmary Y, Brunette DM, Heersche JNM. Differences in vitro between cells derived from periodontal ligament and skin of Macaca Irus. Archs Oral Biol 21: 709-716, 1976.
13. Brunette DM, Melcher AH, Moe HK, Cultrue and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspension. Archs Oral Biol 21: 393-400, 1976.
14. Brunette DM, Janoza RJ, Marmary Y, Chan J, Melcher AH. Interactions between epithelial and fibroblast-like cells in cultures derived from monkey periodontal ligament. J Cell Sci 27: 127-140, 1977.
15. Brunette DM, Heersche JNM, Purdon AD, Sodek J, Moe HK, Assuras JN. In vitro cultural parameters and protein and prostaglandin secretion of epithelial cells derived from porcine res of malassez. Archs Oral Biol 24: 199-203, 1979.
16. Blomlof I, Otteskog P Composition of Human Periodontal Ligament Cells in tissue Culture. Scand. J Dent Res 89: 43-47, 1981.
17. Ragnarsson B, Carr G, Daniel JC. Isolation and growth of human periodontal ligament cells in vitro. J Dent Res 64: 1026-1030, 1985.

18. Piche JE, Carnes DL, Graves DT. Characteristics of a non-fibroblast cell population derived from human periodontal ligament. *J Dent Res* 66: 356 (Abstr No 1998), 1987.
19. Piche JE, Graves DT. Growth and biochemical characteristics of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 67: 243(Abstr No. 1044), 1988.
20. Piche JN, Carnes D, Land Garces DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 68: 761-767, 1989.
21. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Forst RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 67: 66-70, 1988.
22. Nanba H, Nomura Y, Kinoshita M, Shimizu H, Ono K, Goto H, Aral H, Takigawa M, Murayama Y. Periodontal Tissues and Sex Hormones. The effects of Sex Hormones on Metabolism of Fibroblasts Derived from periodontal ligament. *J Japan Ass Periodont* 31: 166-175, 1989.
23. Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol* 61: 103-111, 1990.
24. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasega K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodont Res* 25: 179-185, 1990.
25. Rose GG, Yamasaki A, Pinero GH, Mahan CJ. Human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodont Res* 22: 20-28, 1987.
26. 박 준봉외 17인 : 치주과학, 지영문화사. 6-59, 1988.
27. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 9: 290-296, 1982.
28. Aukhil I, Simpson DM, Schaberg TV. An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs. *J Periodont Res* 18: 643-654, 1983.
29. Aukhil I, Simpson DM, Suggs C, 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.
30. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue Regeneration. *J Clin Periodontol* 11: 494-503, 1984.
31. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue Regeneration, case report. *J Clin Periodontol* 13: 604-616, 1986.
32. Auf'mkolk B, Hauachka PV, Schwartz ER. Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tissue Int* 37: 228-235, 1985.
33. Wergedal JE, Baylink DJ. Characterization of cells isolated and cultured from human bone. *Proc Soc Exp Biol Med* 176: 60-69, 1984.
34. Jacobsen N, Goldhaber P. Bone resorption induced by epithelial and connective tissue from human gingiva in vitro. *J Dent Res* 51: 1683-1689, 1972.
35. Fusenig NE, Boukamp KJ. Multiple stages and genetic alteration in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocyte. *Mol Carcinog* 23:144-158, 1998.
36. Bryan TM, Reddek RR. SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncog* 5:331-357, 1994.
37. Nosagaard H, Clark BFC, Rattan AIS. Distinction between differentiation and senescence and the absence of increased apoptosis in human keratinocytes undergoing cellular aging in vitro.

- Exp Gerontology 31:563-570, 1996.
38. Phillips MA, Stewart BE, Qin Q, Chakraborty R, Floyd EE, Jetten AM, Rice RH. Primary structure of keratinocyte transglutaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9333-9337, 1990.
 39. Tasaka S. Establishment from mouse periodontal ligament of an immortalized cell line(MPDL-22) expressing physiological differentiation phenotype(thesis). *J Osaka Univ Dent Sch* 41:118-135, 1996.
 40. Carlens DL, Nydegger JR, Macdougall M. Establishment of immortalized cell population from periodontal ligament. *J Dent Res* 76:298, 1997.
 41. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. In: Wiley-Liss, New York, 1987.
 42. Meanwell CA. The epidemiology of human papillomavirus infection in relation to cervical cancer. *Cancer Surv* 7:481-497, 1988.
 43. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, Hausen H. Structure and transcription of HPV sequences in cervical cancer cells. *Nature* 314:111-114, 1985.
 44. Kellokoski JK, Syrjanen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjanen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of human papillomavirus infection in women with genital infection. *J Oral Pathol* 21:459-464, 1992.
 45. Syrjanen S. Viral infection in oral mucosa. *Scan J Dent Res* 100:17-31, 1992.
 46. Woodworth CD, Doniger J, Dipaolo JA. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papilloma virus DNA correspond to their association with cervical carcinoma. *J Virol* 86:159-164, 1989.
 47. Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherrick HM, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocyte with type 16 human papillomavirus. *Cariconegensis* 12:1627-1631, 1991.
 48. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8: 3905-3910, 1989.
 49. Munger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel, R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human Keratinocytes. *J Virol* 63: 4417-4421, 1989.
 50. Band V, De Caprio JA, Delmolino L, Kulesa V, Sager R. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol* 65: 6671-6676, 1987.
 51. Watanabe S, Kanda T, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J Virol* 63: 965-969, 1989.
 52. Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D, Van Der Haegen BA. E6 of human papillomavirus in human mammary epithelial cells but in human fibroblasts. *Oncogene* 8: 1407-1413, 1993.
 53. McCormick, JJ, Maher VM. Towards an understanding of the malignant transformation of the malignant transformation of diploid human fibroblasts. *Mutat Res* 199: 273-291, 1988.
 54. Shiga T, Shirasawa H, Shimizu K, Dezawa M, Masuda Y, Shimizu B. Normal Human Fibroblasts Immortalized by Introduction of Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) E6-E7 Genes. *Micribiol Immunol* 41:313-319, 1997.
 55. Harms W, Rothanmel T, Miller K, Harste G, Grassman M, Heim A. Characterization of human myocardial fibroblasts immortalized by human HPV16 E6-E7 genes. *Exp Cell Res* 268:252-261, 2001.

Establishment of Immortalized Human Gingival Fibroblast Cell Lines

Jae-Bong Song¹, Hyun-A Kim¹, Ha-Na Hyun¹, Eun-Cheol Kim², Hyung-Keun You¹, Hyung-Shik Shin¹

¹Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

²Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Wonkwang University

Human gingival fibroblasts have proven to be useful as a species specific cell culture system in various systems on periodontal disease and regeneration. However, their use is limited, since they are hard to obtain and lifespan is short due to replicative senescence. To overcome these disadvantages, we transfected primary human gingival fibroblasts by the E6 and E7 genes of the Human papilloma virus (HPV) 16. The full length of HPV 16 E6 and E7 was cloned from the pBR322 into BamHI and Sal I of a pBabe vector including hygromycin B resistance. Before pBabeE6/E7 plasmid transfection, pEGFP including G418 resistance was transfected into primary GF to check the transfection efficiency. pBabe E6/E7 plasmid was transfected using Lipofectamine plus following manufacturer's instruction into primary normal human gingival fibroblasts in 60mm dishes with FBS free DMEM. After 2 days of transfection, the cells were treated with hygromycin for 2 weeks until the transfected control cells died. The resulting hygromycin resistant colonies were pooled, and cloned, and successful transfection was established for immortalized gingival fibroblast cell lines.

Immortalized GF cells showed stellate shape, that is similar to that of orange grains, and more rapid growth and higher proliferation than that of primary gingival fibroblasts.

This cell line overcame crisis and could be cultured over 30 subcultures, could be used for three dimensional culture, epithelial-mesenchymal interaction study.

Key word; Gingival Fibroblast, Cell line, Immortalization, HPV, Growth, Proliferation