

# 생체유리와 천연산호 골이식재가 치주인대 섬유아세포 활성화에 미치는 영향

심성규 · 한수부

서울대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

치주질환의 진행을 막고, 파괴된 치주조직을 재생하여 그 기능적인 회복을 이루는 것이 치주치료의 궁극적인 목표라고 할 수 있다<sup>1)</sup>. 치주질환으로 인해 파괴된 치조골 회복과 치조골 증대를 위하여 여러 가지 골이식재가 연구되고 사용되어왔다. 골이식재는 크게 자가골, 동종골, 이종골 및 합성골 등으로 대별될 수 있다. 현재까지는 백악질형성 및 골형성능력에 있어서 자가골과 동종골이 가장 효과가 있다고 보고되고 있으나 자가골은 골채취를 위한 2차적인 수술 및 손상, 시술후 합병증, 치근흡수, 채취량의 한계와 필요한 형태부여가 어렵다는 등의 단점이 있다. 이러한 문제의 해결을 위해 동종골 이식이 연구되었으나, 이 또한 질병의 전이가능성, 불확실한 면역반응 및 골편흡수의 문제가 보고되었다<sup>2-7)</sup>. 그래서 생물학적 적합성을 가지며 새로 형성된 신생골로 대체될 수 있는 골전도능 및 골유도능을 갖는 합성골 이식재가 연구되어왔다. 여러 합성골 중 골질의 주 무기질성분인 인산칼슘계 생체재료인 hydroxyapatite(HA)와 tricalcium phosphate(TCP)가 많이 연구되고 사용되었다. 이들은 안전하고 거부반응을 일으키지 않지만, 신부착을 증진시키는 능력이 작고 입자들은 주로 결합조직에 둘러싸이게 되며 골조직생성이 적은 단점이 있다<sup>8-14)</sup>. 최근에는 생체유리<sup>15)</sup>와 천연

연산호<sup>16)</sup>가 골이식재로 사용되고 있다. 생체유리는 Hench<sup>17)</sup>에 의해 1969년에 개발되었는데 일반유리(72% SiO<sub>2</sub>, 16% Na<sub>2</sub>O, 12% CaO ; 무게비)와 달리 SiO<sub>2</sub>의 농도를 40-45%로 줄이고 Na<sub>2</sub>O와 CaO의 농도를 높인 후 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>를 첨가하여 골조직과 결합할 수 있는 연유리를 제조하여 이를 생체유리라고 하였다. 그 후 일련의 연구 및 실험을 통하여 생체유리 중 무게비 45% SiO<sub>2</sub>, 24.5% CaO, 24.5% Na<sub>2</sub>O, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>로 조성된 유리가 생체친화성과 골조직에 결합하는 능력이 가장 뛰어나므로 이를 45S5생체유리라고 명명하였다<sup>18,19)</sup>. 생체유리가 골조직에 결합하는 속도는 SiO<sub>2</sub>의 양에 달려있다. 42-53% SiO<sub>2</sub>로 구성된 이식재는 며칠내에 매우 빠르게 골과 결합하고 연조직과도 결합하며, 54-60% SiO<sub>2</sub>로 구성된 것은 골과 결합하는데 2-4주가 소요되고 연조직과는 결합하지 못한다. 60%이상의 SiO<sub>2</sub>로 구성된 것은 생체불활성으로 골 및 연조직과 부착되지 못한다<sup>21,23)</sup>. Schepers 등<sup>24-26)</sup>은 생체유리는 골조직과 결합하는 능력이 있고, 골전도성의 특성에 의해 골의 성장을 촉진시킨다고 하였는데, 생체유리에 의해 유도되는 골형성 과정을 다음과 같은 가설로 설명하였다. 생체유리가 이식되면 국소적인 pH의 변화에 반응하여 그 표면에서 조직액과 수분내에 이온교환에 의해 calcium-phosphorous-rich layer에 둘러싸인 SiO<sub>2</sub>가 풍부한 실리카겔로 변한다. 입자표면의 CaP-rich layer에 미세한 균열

이 생기고 이 균열을 통하여 탐식세포들이 실리카겔의 내부로 침투하여 겔의 내부에서 부분적인 흡수를 일으켜 CaP-rich layer를 가진 주머니를 형성한다. 이 주머니 내부는 조직액의 유동이 없고 원시간엽세포들의 이동이 없어 원시세포들이 조골세포로 분화하는데 좋은 환경을 제공하여 기존 골조직으로부터의 조골세포의 유입없이도 골형성이 가능하다는 것이다. Wilson<sup>20,22)</sup>과 Fetner<sup>49)</sup>은 원숭이를 이용한 실험에서 생체유리가 수산화인회석이나 TCP보다 골결손부 충전과 신부착형성에 더 효과적이라고 보고하였고, 골결손부 변연과 떨어진 생체유리입자 주위에서도 신생골이 형성되는 것을 관찰하여 생체유리가 골전도성뿐만 아니라 골형성능력이 있다고 하였다. 이 등<sup>27)</sup>은 수종의 생체유리와 다공성수산화인회석을 개의 골연하결손부에 이식하고 조직학적으로 비교하여 생체유리가 다공성수산화인회석에 비해 흡수가 빠르고 신생골형성량이 더 많았다고 보고하였다. 엄 등<sup>35)</sup>은 개의 골연하결손부에 자가골, 천연산호 및 생체유리를 이식하고 혈소판 유래 성장인자의 분포를 관찰하여 천연산호에 비해 자가골이나 생체유리 이식이 치주치료 후 골충전과 신부착형성의 가능성을 높일 수 있다고 주장하였다. 1971년에 새로운 신생골을 형성할 수 있는 산호구조에 대한 연구가 시작된 이래 천연산호 이식재는 Porites종의 바다산호를 가공한 생체재료로서 생체 흡수성의 다공성인 합성골 이식재이다. 화학적으로는 98% 이상이 탄산칼슘으로 되어 있으며 나머지 1% 아미노산등의 oligo-elements와 0.005% 중금속이 aragonite 결정체의 형태로 되어있고 단백질이 없으며, 구조적으로는 해면골과 유사하고 100-220 $\mu$ m의 소공을 가진 다공성의 구조로 되어있다<sup>28,29)</sup>. 이와 같은 천연산호의 구조는 혈관분포를 용이하게 하고 골 성장을 유도하며, 천연산호 결정체의 화학적 성분과 성질은 재생과정을 결정하게 되는데, 천연산호 이식재의 광물질 성분은 여러면에서 골의 성분과 비슷하며 특히 칼슘의 함량과 미량의 원소들에서 유사하다. 그 중 strontium과 fluoride등의 미량원소들은 골에서도 존재하며, 이들은 석회화과정과 골세포에서의 효소반응 활성화에 중요한 역할을 한다<sup>31)</sup>. Yukna<sup>16)</sup>는 유공성의

천연 탄산칼슘 이식재는 생리적으로 흡수성 HA인 TCP와 유사하지만 화학적으로 달라서 다른 합성골이나 동종골의 경우 골형성을 위한 일련의 과정으로 HA가 carbonate로 표면전환이 필요하지만 탄산칼슘의 경우 이러한 전환단계가 필요없으므로 골형성과정이 신속히 진행된다고 하였다. Guillemine 등<sup>28,29)</sup>, Ouhayoun 등<sup>32)</sup>과 Lekovic 등<sup>30)</sup>은 동물실험에서 천연산호를 골결손부위에 이식할 경우 점진적으로 흡수되어 신생골로 대체된다고 보고하였다. Issahakian 등<sup>31)</sup>은 사람의 치조골 결손부위에 천연산호를 이식한 결과 치주낭이 감소하며 골형성이 증진되고 천연산호는 점차적으로 흡수되어 골로 대체되는 양상을 보인다고 하였다. Yukna 등<sup>16)</sup>은 천연산호를 사용해서 63.3%의 골충전을 보여 15.5%의 충전을 보인 대조군에 비해 우수한 골충전 효과를 보인 것으로 보고하였다. 심 등<sup>33)</sup>은 사람의 양측성 치조골 결손부위에 다공성수산화인회석과 천연산호를 이식한 후 6개월째 재진입수술한 결과 치주낭깊이의 감소, 골결손부 충전효과가 서로 비슷하였다고 보고하였다. 이 등<sup>34)</sup>은 개에서 인공적으로 형성한 골연하결손부를 이용한 실험에서 천연산호가 생체유리 45S5보다 신생골 형성 면에서 더 우수하다고 보고하였다. 한편 근래에는 이러한 골이식재들이 조직유도 재생술식과 함께 사용되는 경우가 많은데 조직유도 재생술식은 치주조직의 치유과정 중 상피세포의 근단이동을 방지하고 치은결합조직과 골세포들이 치근면과 접촉하지 못하도록 하면서 치주인대섬유아세포가 선택적으로 성장하여 백악질, 치주인대 및 치조골의 재생을 목적으로 하고 있다<sup>36)</sup>. 그러므로 치주치료 초기에 이식재들의 치주인대섬유아세포에 미치는 영향은 치주조직재생의 성공에 매우 중요하며 골이식재의 종류에 따라 치주조직 치유양상이 세포수준에서 다르게 나타날 것이다<sup>37)</sup>. 그러나 임상과 동물실험간의 차이 이외에도 치조골파괴의 다양한 양상 및 치주조직 치유와 재생에 관련된 여러 요인들 때문에 골이식재 사용시 치주조직재생 시기에 발생하는 세포수준의 반응을 이해하기 힘들다<sup>38)</sup>. 이 연구의 목적은 생체유리45S5와 천연산호 골이식재가 치주인대섬유아세포활성에 미치는 영향을 알아보고

상호 비교평가 하는 것으로 치주인대섬유아세포를 배양하여 두 골이식재 입자의 존재시 세포들의 모양과 미세구조, 세포의 증식, 단백질과 DNA생성, alkaline phosphatase (ALP)활성도 및 석회화 결절의 형성을 관찰하는데 있다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 치주인대섬유아세포의 배양

치주인대섬유아세포는 교정목적으로 발거한 견강한 생활치아에서 채취하여 배양하였다. 발거전에 큐렛을 이용하여 치태와 치석을 제거한 후 생리식염수로 수차례 세척하였다. 발거한 치아는 치은결합조직에 오염되지 않도록 치근 중앙 1/3부위를 큐렛으로 조심스럽게 긁어서 채취하였다. 채취된 치주인대는 수술도로 세절한 다음, 35mm 세포배양 접시(NUNC™, Denmark)에 부착시키고, 10,000 units of Penicillin, 10,000  $\mu$ g of Streptomycin 및 25  $\mu$ g/ml of Amphotericin-B가 함유된 1% antibacterial-antifungal solution(Gibco, USA)과 10% FBS(Gibco, USA)를 첨가한  $\alpha$  minimum essential medium( $\alpha$ -MEM: Gibco, USA)을 배지로 하여 습도 95%, 온도 37℃, 5% CO<sub>2</sub>와 95% O<sub>2</sub>를 유지하면서 배양하였다. 배양액은 매 3일간격으로 교환하면서 밀생단일층이 얻어질 때까지 배양하였다. 밀생배양이 얻어지면 배양액을 제거하고 0.25% trypsin-EDTA(Gibco, USA)를 가하여 37℃ CO<sub>2</sub> incubator(Forma Scientific, Inc., USA)에서 5분간 배양하여 세포를 탈리시키고  $\alpha$ -MEM을 동량 이상 첨가하여 희석시킨 다음, 4℃에서 1200 rpm으로 10분동안 원심분리하고 상층액을 제거한다. 수집된 치주인대세포는 상기 배양액으로 세포부유액을 만든 후 3개의 100ml 세포배양접시(NUNC™, Denmark)에 나누어 분주하고 같은 방법으로 계속 배양한다. 이와 같은 방법으로 계속 계대배양하여 4-6회 계대배양된 세포를 실험에 사용하였다.

### 2. 생체유리 및 천연산호 골이식재의 처리

생체유리45S5(BIOGRAN®(Orthovita, USA):BG)와 천연산호(BIOCORAL®(Inoteb, France):BC) 골이식재는 분마기로 분쇄하여 40 $\mu$ m 크기를 가진 체(Spectrum Medical Industries, Inc., USA)로 걸러 40 $\mu$ m 이하의 입자만을 모아 ethylene oxide gas(Castle, USA)로 소독하여 실험에 사용하였다.

### 3. 치주인대섬유아세포와 골이식제의 혼합배양

배양된 치주인대섬유아세포를 24-well plate(NUNC™, Denmark)에 well 당  $3 \times 10^4$  cell로 분주하고 세포가 배양기에 부착되는 것이 방해받지 않도록 골이식재는 세포 분주후 4시간 후에 첨가하였다. 분쇄된 생체유리45S5와 천연산호는 각각 0.3mg/ml 및 1.0mg/ml의 농도로 배지에 첨가하여 4가지 실험군 즉 생체유리45S5 0.3 mg/ml(BG0.3) 생체유리45S5 1.0mg/ml(BG1.0), 천연산호 0.3mg/ml(BC0.3) 및 천연산호 1.0mg/ml(BC1.0)과 아무런 골이식재도 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하여 배양하였다.

### 4. 치주인대섬유아세포의 모양 관찰

배양 전기간 동안 대조군 및 각 실험군의 세포모양을 위상차현미경(Olympus, Japan)을 통해 관찰하였다. 치주인대섬유아세포의 세포내 미세구조 변화양상 및 이식재입자의 부착 및 포식양상을 관찰하기 위해 배양 6일 후 각 실험군 및 대조군의 배양액을 제거하고 0.25% trypsin-EDTA를 가하여 세포를 탈리시켜 모은 후 2.5% glutaraldehyde용액으로 전고정하였다. 고정 후 0.1M cacodylated buffer로 수세하고 증류수에 섞은 1% osmium tetroxide로 90분간 재고정하고 ethyl alcohol로 단계적인 탈수과정을 거친 다음 초박절편을 제작하고 toluidine blue로 염색하여 투과전자현미경(JEM 1200 EXII, JEOL, Japan)으로 관찰하였으며, 탈수과정을 거친 시편을 임계온도로 건조시켜 gold palladium을 도포한 후 주사전자현미경(JSM-840A, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

## 5. 치주인대섬유아세포의 Alkaline Phosphatase 활성도 측정

배양후 5일 및 9일째에 배양된 세포를 수집하여 alkaline phosphatase(ALPase) 활성도를 측정하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 trypsin-EDTA로 cell을 탈리시킨 후, 세포부유액을 1500rpm으로 8분동안 원심분리하였다. 원심분리후 상층액은 제거하고 0.3ml의 DDW를 첨가하여 초음파분쇄기(Fisher, USA)로 30% output으로 30초동안 초음파분쇄하였다. para-nitrophenylphosphate(PNPP : Sigma Chemical Co. USA)를 substrate로 사용하여 0.1M Glycin-NaOH buffer( pH 10.4 )하에 37℃에서 30분동안 세포분쇄액과 반응시키고 분해된 para-nitrophenol(PNP : Kanto Chemical Co., Inc. Japan )를 ELISA reader(Thermo max, MelanoPark, USA)로 410nm에서 비색정량하였다.

## 6. 치주인대섬유아세포의 단백질과 DNA 합성 측정 및 증식을 관찰

단백질 합성은 세포배양 4일 후, DNA 합성은 세포배양 1, 2, 3, 4일 후에 각각 측정하였다. 생체유리와 천연산호를 넣어 배양한 치주인대섬유아세포 배양액의 1/2를 제거한 후 0.185MBq <sup>3</sup>H-leucine(specific activity 2.74 TBq/mmol :Amersham LIFE SCIENCE, UK), 0.185MBq <sup>3</sup>H-proline(specific activity 962 TBq/mmol :Amersham LIFE SCIENCE, UK), 0.185MBq <sup>3</sup>H- thymidine(specific activity 2.81 TBq/mmol :Amersham LIFE SCIENCE, UK)을 첨가한 배양액으로 교체하고 37℃ CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 4℃의 5% TCA 1ml를 가한 다음 10분동안 얼음 위에서 방치한 후 제거하였다. 이 과정을 3회 반복한 후 0.5N NaOH 1ml를 가하여 37℃ incubator에서 30분간 배양하고 10μl를 취하여 4ml의 cocktail solution에 넣은 후 β- counter(Beckman Ins, USA)를 이용하여 방사능량을 측정하였다. 배양 1, 3, 5, 7, 9일째에 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 배양접시에서 탈락시

킨후 hemacytometer로 세포수를 산정하여 치주인대섬유아세포의 증식률을 관찰하였다.

## 7. 석회화결절의 형성 관찰

석회화 결절의 형성을 관찰하기 위해 실험군과 대조군에 50μg/ml ascorbic acid(Sigma, USA), 10mM β-glycerophosphate(Sigma, USA), 10<sup>-7</sup>M Dexamethasone(Sigma, USA)을 부가적으로 첨가한 배지로 장기배양하였다. 배양액을 2-3일 간격으로 교체하면서 30일 경과후 Arizalin red 염색법으로 염색하여 형성된 석회화 결절을 광학현미경하에서 관찰하였다.

## 8. 통계분석

각각의 측정은 triplicate로 하여 측정하였고 통계적 검정은 two tailed unpaired t- test로 유의성을 5% 및 1%의 위험수준으로 실시하였다.

## III. 연구결과

### 1. 치주인대세포의 모양관찰

#### A. 위상차현미경관찰

배양 4일째에, 대조군은 일정한 방향성이 없이 배양접시에 잘 부착하여 단일층을 이루고 자라고 있었다. 세포들은 방추형, 별모양등 비교적 다양한 모습을 하고 있으며 세포돌기가 잘 발달되어 있었다(Figure 1). 배양 4일째에, 모든 실험군이 대조군과 유사한 양상을 보이고 있고 이식재 입자들이 세포들 사이 및 세포체와 부착되어 산재하여 관찰되었다(Figure 2, 3, 4, 5). 배양액 교환시에도 이들 입자들은 탈락하지 않고 세포체에 부착되어 잘 유지되고 있었다.

#### B. 투과전자현미경관찰

BG1.0군의 투과전자현미경 소견에서는 세포내로 이식재입자가 포식되어 포식용해소체 속에 존재하

고 포식용해소체 내에 세포의 파편도 보였으며 세포는 조면소포체가 잘 발달되어 있고 조면소포체가 팽창되어있는 것도 나타나며 여러개의 용해소체도 관찰되었다(Figure 6). BC0.3군의 투과전자현미경 소견에서 이식재입자가 세포내에 포식된 모습을 보이고 세포내에 많은 미토콘드리아와 용해소체 및 잘 발달된 조면소포체가 관찰되었다(Figure 7). 이들 이식재 입자들의 포식에 의한 세포내의 미세구조에 별다른 변화는 관찰되지 않았다. BC1.0군의 투과전자현미경 소견에서 이식재입자가 세포에 밀접하게 부착되어 있는 것이 관찰되었다(Figure 8).

### C. 주사전자현미경관찰

BG0.3군의 주사전자현미경 소견에서 이식재입자들이 세포에 부착된 모습이 관찰되었다(Figure 9). BC0.3군의 주사전자현미경 소견에서 이식재입자들

이 세포로 덮여있는 모습이 관찰되었다(Figure 10).

## 2. Alkaline phosphatase 활성도 측정

대조군과 BC0.3, BC1.0, BG0.3 및 BG1.0 군간의 ALPase 활성도 비교는 배양 5일째에는 대조군과 BG0.3군만 차이가 없고 나머지군은 대조군보다 유의성 있게 작았다. 또 BC1.0군이 BC0.3군보다 유의하게 작았다. 배양 9일째에는 BG0.3군만 대조군과 차이 없고 나머지 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 작았다 ( $P < 0.05$ ). 같은 농도의 생체유리45S5군과 천연산화군간에는 5일째와 9일째 모두 생체유리45S5군이 높았지만 통계적 유의성은 없었다(Table 1, Figure 11).

## 3. 단백질 합성 측정

Table 1. Effects of bioactive glass and natural coral on ALPase activities of PDL cells.

Day	ALPase Activity(nM PNP/30min/10 <sup>4</sup> cells)				
	Control	Natural coral 0.3mg/ml	Natural coral 1.0mg/ml	Bioactive glass 0.3mg/ml	Bioactive glass 1.0mg/ml
5	3.73±0.52	2.41±0.68*	1.37±0.12**†	3.65±1.36	1.78±0.73*
7	4.95±0.64	3.11±0.48*	2.84±0.36**	4.46±1.16	2.29±0.73*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  : significantly lower than control.

† $P < 0.05$ , : 1 mg/ml of Biocoral was significantly lower than 0.3 mg/ml of Biogran.

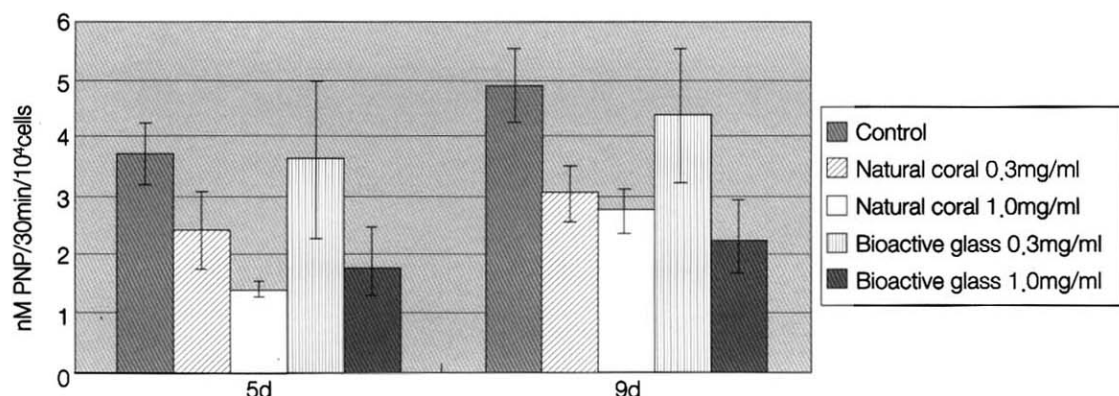


Figure 11. Effects of bioactive glass and natural coral on ALPase activities of PDL cells.

Table 2. Effects of bioactive glass and natural coral on  $^3\text{H}$ -proline and  $^3\text{H}$ -leucine incorporation by PDL cells.

	$^3\text{H}$ -proline and $^3\text{H}$ -leucine uptakes(cpm)				
	Control	Natural coral 0.3mg/ml	Natural coral 1.0mg/ml	Bioactive glass 0.3mg/ml	Bioactive glass 1.0mg/ml
$^3\text{H}$ -proline	55.25 $\pm$ 6.95	58.25 $\pm$ 12.50	54.25 $\pm$ 5.12	61.75 $\pm$ 11.59	46.50 $\pm$ 9.03
$^3\text{H}$ -leucine	18.67 $\pm$ 1.53	20.00 $\pm$ 4.24	18.50 $\pm$ 5.69	19.00 $\pm$ 7.81	21.50 $\pm$ 6.02

No statistical differences were found between any two groups in uptakes of  $^3\text{H}$ -proline and  $^3\text{H}$ -leucine.

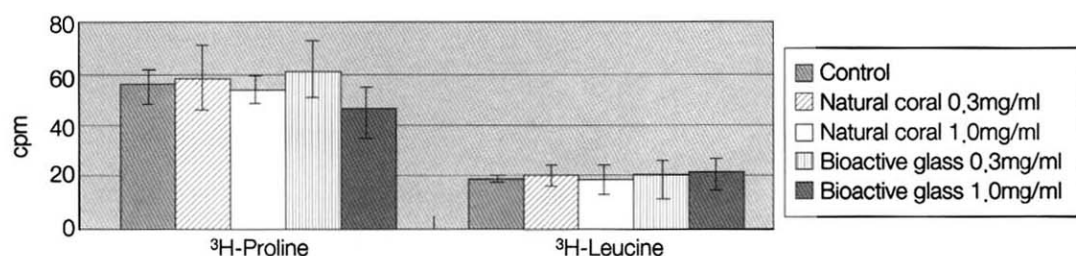


Figure 12. Effects of bioactive glass and natural coral on  $^3\text{H}$ -proline and  $^3\text{H}$ -leucine incorporation by PDL cells.

배양 4일 후의 측정결과, 대조군과 실험군 모두  $^3\text{H}$ -proline과  $^3\text{H}$ -leucine의 흡수량에서 유의성 있는 차이는 없었다 (Table 2, Figure 12).

#### 4. DNA 합성 측정

$^3\text{H}$ -thymidine의 흡수는 배양 1일째에는 대조군이 모든 실험군보다 유의하게 높았다. 특히 천연산호군

과의 차이가 컸다( $P < 0.01$ ). 실험군간에서는 BG0.3군이 BC0.3군보다 유의성 있게 높았다( $P < 0.05$ ). 배양 2일째에는 대조군이 두 천연산호군보다 유의하게 높았지만( $P < 0.01$ ) 생체유리군과는 차이가 없었다. 실험군에서는 BC1.0군이 BC0.3군보다 유의하게 낮았으며( $P < 0.05$ ), BG0.3군과 BG1.0군은 모두 같은 농도의 Biocoral군보다 유의하게 높았다( $P < 0.01$ ). 배양 3일째에는 모든 실험군이 대조군에 비해 현저히 낮았다.

Table 3. Effects of bioactive glass and natural coral on  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation by PDL cells.

Day	$^3\text{H}$ -thymidine uptakes(cpm)				
	Control	Natural coral 0.3mg/ml	Natural coral 1.0mg/ml	Bioactive glass 0.3mg/ml	Bioactive glass 1.0mg/ml
1	492.0 $\pm$ 60.8	192.8 $\pm$ 19.19**	189.5 $\pm$ 9.19**	284.7 $\pm$ 60.0**	191.0 $\pm$ 28.8**
2	604.3 $\pm$ 37.0	449.3 $\pm$ 41.6**	291.5 $\pm$ 17.7**†	617.7 $\pm$ 38.1**	564.0 $\pm$ 12.5**
3	2711.5 $\pm$ 48.8	866.5 $\pm$ 74.2**	309.3 $\pm$ 52.0**‡	1497.0 $\pm$ 302.6*	1171.5 $\pm$ 34.6****
4	558.5 $\pm$ 113.8	543.3 $\pm$ 135.9	365.5 $\pm$ 43.1	533.0 $\pm$ 31.3	368.0 $\pm$ 107.2

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  : significantly lower than control.

† $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  : Biogran was significantly higher than Biocoral at the concentration of 0.3 mg/ml.

\*\* $P < 0.01$  : Biogran was significantly higher than Biocoral at the concentration of 1 mg/ml.

‡ $P < 0.01$ , : Biocoral 1mg/ml was significantly lower than Biocoral 0.3 mg/ml.

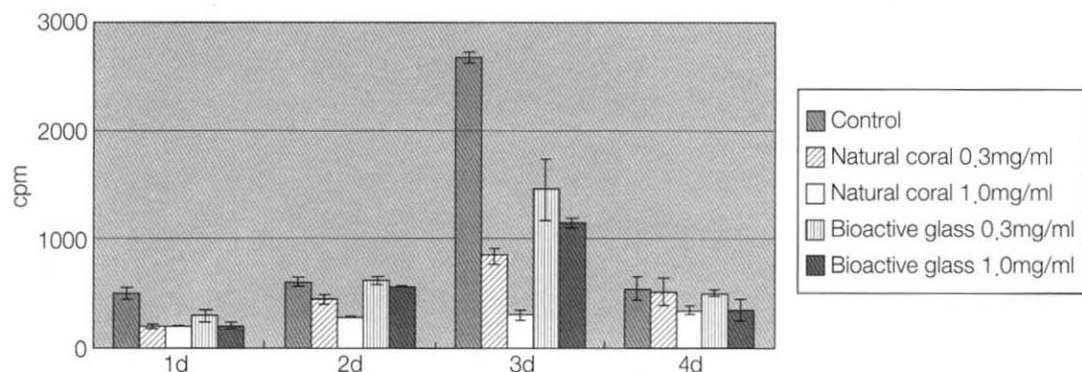


Figure 13. Effects of bioactive glass and natural coral on 3H-thymidine incorporation by PDL cells.

또 BC1.0군이 BC0.3군 보다 낮았다. BG1.0군이 같은 농도의 천연산호군보다 높았다. ( $P < 0.01$ ). 배양4일째에는 대조군 및 모든 실험군이 차이가 없었다. BG0.3군과 BG1.0군간에는 1-4일 동안 차이가 나타나지 않

았다. 각 실험군내에서의 시간별 추이를 보면 3일까지는 대조군에 비해 낮은 DNA 합성을 보이고 있으나 4일째에는 차이가 없었다 (Table 3, Figure 13).

Table 4. Effects of bioactive glass and natural coral on the PDL Cell proliferation.

Day	cell number ( $\times 10^4$ )				
	Control	Natural coral 0.3mg/ml	Natural coral 1.0mg/ml	Bioactive glass 0.3mg/ml	Bioactive glass 1.0mg/ml
1	3.00 $\pm$ 0.20	2.75 $\pm$ 0.20	2.67 $\pm$ 0.11	2.67 $\pm$ 0.24	2.58 $\pm$ 0.11
3	3.31 $\pm$ 0.20	3.08 $\pm$ 0.12	2.91 $\pm$ 0.12*	2.83 $\pm$ 0.42	2.83 $\pm$ 0.12*
5	4.08 $\pm$ 0.31	3.91 $\pm$ 0.31	3.91 $\pm$ 0.42	3.75 $\pm$ 0.54	3.67 $\pm$ 0.12
7	4.67 $\pm$ 0.47	4.58 $\pm$ 0.23	4.25 $\pm$ 0.35	4.50 $\pm$ 0.25	4.00 $\pm$ 0.41
9	6.41 $\pm$ 0.42	6.25 $\pm$ 0.20	6.25 $\pm$ 0.54	6.41 $\pm$ 0.42	6.33 $\pm$ 0.42

\* $P < 0.05$ : significantly lower than control.

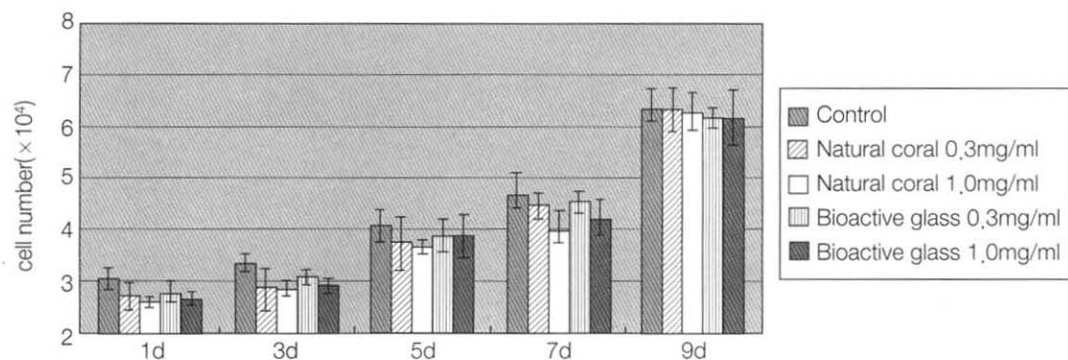


Figure 14. Effects of bioactive glass and natural coral on the PDL Cell proliferation.

## 5. 세포의 증식을 측정

배양 1, 3, 5, 7, 9일 쯤의 세포수를 측정한 결과, 배양 3일째에서 BG1.0군과 BC1.0군이 대조군에 비하여 유의성 있게 세포수가 적었고 5일, 7일과 9일에는 대조군과 유의성있는 차이는 보이지 않았다(Table 4, Figure 14).

## 6. 석회화결절의 형성관찰

이식재입자와 함께 세포를 30일간 장기배양결과, 대조군에 비하여 실험군에서 석회화결절의 형성이 더 많이 관찰되었다. 석회화결절은 이식재입자를 중심으로 침착되거나 이식재입자들과 석회화결절들이 서로 혼합되어 관찰되었다(Figure 15, 16, 17, 18, 19).

## IV. 총괄 및 고찰

최근에는 조직유도재생술과 함께 다양한 골이식재가 사용되고 있는데 조직유도재생술은 상피세포들의 근단이동을 방지하고 골세포들과 치은결합조직세포를 배제시키면서 치주인대에서 유래되는 전구세포들이 백악질과 치주인대, 골 등과 같은 조직을 재생시킬 수 있는 능력을 가졌다는 이론을 전제로 하고 있다<sup>36)</sup>. 치주인대섬유아세포가 이와 같이 치주조직재생에 중요한 역할을 하는 이유는 치주인대섬유아세포내에 조섬유아세포, 조백악세포 및 조골세포의 전구세포가 존재한다는 치주인대섬유아세포의 이중성에 있다<sup>40)</sup>. 특히 치주인대섬유아세포가 조골세포와 유사한 특징이 있다는 것이 여러 연구<sup>41-43)</sup>에서 보고되었으며 in vivo연구에서 치주인대섬유아세포가 치주수술부위에 도달 및 증식하는 것이 치주조직재생에 필수적이라는 것이 알려졌다<sup>36,40)</sup>. 그러므로 골이식재들이 치주인대섬유아세포의 분화와 증식에 어떤 영향을 주는가 하는 것은 치주조직재생에 결정적인 역할을 한다<sup>37)</sup>. 현재까지 생체유리<sup>15-23)</sup>와 천연산호<sup>16,28-33)</sup>에 대한 임상 및 동물실험은 다수 있었지만 아직 이 두 이식재가 세포수준에서 치주인대섬유아세포에 어떤 영향을 주는지에 대한 연구가 이

루어지지 않았다. 이 연구에서는 생체유리 45S5와 천연산호가 치주인대섬유아세포활성에 미치는 영향을 in vitro 실험으로 알아보고자 하였다.

ALPase는 칼슘과 인의 대사에 관여하는 효소로 석회화과정에 관여하는 정확한 기능은 알려져 있지 않지만 조골세포의 중요한 지표로서 생산, 분비되는 특징적인 생화학적 산물로 pH 8-10 정도에서 monoester phosphate를 가수분해하여 주로 골이형성될 때 높은 농도로 발현된다고 보고되었고<sup>42)</sup>, Nojima 등<sup>43)</sup>은 골형성 이전의 세포대사와 칼슘과 인이온이 결정화되기 이전의 골기질 형성에 주로 관여한다고 하였다. 치주인대섬유아세포가 조골세포와 유사한 특징으로는 ALPase 활성도가 높고, 전체 collagen의 95%이상이 type I collagen으로 구성되고 부갑상선 호르몬에 대한 반응으로 cyclic AMP가 증가하고, osteonectin과 biglycan과 같은 골관련단백질을 생합성한다는 점을 들 수 있다<sup>41-43)</sup>. 그러나, 조골세포의 지표가 아직 밝혀지지 않았고, ALPase 활성도를 포함해서 다른 요소들도 조골세포임을 증명하는 결정적인 특징이라고는 할 수 없다. 하지만 치주인대섬유아세포가 일부 조골세포와 유사한 성질을 갖고 있다는 것은 거의 확실한 사실로 받아들여지고 있다. 현재로서는 in vitro 실험에서 치주인대섬유아세포로부터 석회화 결절 형성을 유도하는 것이 치주인대섬유아세포가 조골세포와 조백악세포로 분화하여 치조골과 백악질의 재생에 관여한다는 증거가 될 수 있다고 하였다<sup>41)</sup>. 이 연구에서도 배양된 치주인대섬유아세포의 조골세포적 특징을 알아보기 위해 ALPase 활성도를 측정하였다. 대조군과 실험군 모두에서 ALPase 활성도가 나타났고, 5일에서 9일 사이에 점차 증가하여 치주인대섬유아세포가 조골세포의 특징을 가질 수 있음을 보여주었고 이는 치주인대섬유아세포가 in vitro에서 증식하여 밀집상태를 이룰 때까지 ALPase 활성도가 점차 증가하였다는 Matsuda<sup>45)</sup>등의 보고와 일치하였다. Alliot<sup>44)</sup>등은 in vitro에서 치주인대섬유아세포에 HA 입자를 첨가하고 ALPase활성도를 측정하여 배양 5일에서 8일까지 대조군이 실험군보다 ALPase의 활성도가 높고 증가 정도가 더 큼을 보고하면서 HA 입자가 일시적으로



치주인대섬유아세포의 분화를 역행시킬 가능성이 있다고 하였다. 이번 실험에서도 실험군이 대조군보다 ALPase 활성도가 적었는데 특히 BC1.0군에서 더욱 차이가 많았다. Bellows<sup>(46)</sup> 등은 ALPase는 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가지므로 인단백질이 석회화의 핵으로서의 역할을 하며 ALPase는 석회화 초기에 주로 작용하고 활성도도 많았다가 석회화가 시작하면서 감소한다고 하였다. 이 연구에서 모든 군에서 배양 5일에서 9일까지 ALPase 활성도가 점차 증가함을 보여 치주인대섬유아세포가 9일간의 배양시까지의 석회화 결절을 생성하지 않음을 시사하는 것으로 보이며, 배양 9일까지는 생체유리45S5나 천연산호도 석회화를 촉진시키지는 않는 것으로 보인다. Arceo<sup>(41)</sup> 등은 in vitro 실험에서 높은 ALPase 활성도를 나타내는 치주인대섬유아세포들이 낮은 수준의 ALPase 활성도를 나타내는 치주인대섬유아세포들에 비해 석회화 정도가 빠르거나 증가하는 것은 아니라고 하여, 석회화를 촉진하는 다른 어떤 요소가 치주인대섬유아세포에 존재할 수 있음을 추측하게 해 주었으며, 모든 치주인대세포에서 석회화 기간동안 ALPase 활성도가 증가할 가능성이 있다고 하였다. 그러므로 이 실험의 실험군의 ALPase 활성도가 대조군보다 적게 나타난 것으로 이식재입자가 치주인대섬유아세포의 조골세포적 특징을 감소시킨다고 생각할 수는 없다.

이번 연구의 주사전자현미경 소견에서 치주인대섬유아세포가 두 이식재를 포식하고 있는 소견과 다른 선행 연구들의 치은섬유세포<sup>(47)</sup>, 치수섬유세포<sup>(48)</sup> 및 치주인대섬유아세포<sup>(44)</sup>들이 HA 입자를 포식한다는 보고로 미루어 치주인대섬유아세포가 이식재들을 포식하려는 성향이 있는 것으로 보인다. Nohutcu 등<sup>(49)</sup>은 미분화세포가 조골세포로 분화하기 위한 가장 보편적인 자극제를 칼슘염이라 하였고, 치주인대섬유세포가 HA를 포식하고 세포 내에서 용해하여 세포내의 칼슘 농도를 높이는 것이 세포의 변화를 가져올 수 있다고 주장하였다. 그러므로 실험군의 세포들이 이식재입자를 포식 용해하여, 세포내의 이

온변화로 조골세포로의 분화가능성을 생각할 수 있다.

치주인대섬유아세포의 주 기능 중 하나는 세포의 기질 물질을 생산해 내는 것인데<sup>(37,38)</sup> 우리들의 연구에서는 collagen 생성량의 차이를 알아보기 위해서 세포들의 <sup>3</sup>H-proline과 <sup>3</sup>H-leucine의 흡수 정도를 알아보았다. 배양 4일째에 대조군과 실험군 모두 <sup>3</sup>H-proline과 <sup>3</sup>H-leucine 흡수가 유사한 것으로 미루어 세포의 기질 물질 생성은 4일째까지는 이식재의 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 앞선 in vivo 연구들<sup>(37,38)</sup>에서 두 이식재의 긍정적인 결과들이 보고 되고 있지만 본 연구의 결과로 미루어 보면 이들 이식재가 세포수준에서 세포의 기질생산에 있어 유의적인 유도효과를 가지지는 않는 것으로 생각된다.

이 연구에서 세포의 증식을 알아보기 위해 <sup>3</sup>H-thymidine 흡수를 측정하여 DNA 합성을 관찰한 결과 관찰 3일 까지는 대조군에 비해 두 이식재 모두 치주인대섬유아세포의 DNA 합성을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 HA의 치수섬유아세포<sup>(48)</sup>와 치주인대섬유아세포<sup>(44)</sup>의 DNA 합성에 미치는 효과를 알아본 연구들과 비슷한 결과이다. 이번 연구에서 세포들이 대조군과 비슷하게 단백질을 합성하고 있고 세포들의 미세구조가 잘 유지되고 있으며 관찰 4일째의 측정결과 대조군과 별다른 차이가 나타나지 않는 것으로 보아, 이 DNA 합성 억제 효과는 세포들의 손상에 기인한 것보다는 다른 요인, 즉 세포의 밀도, 배양액의 구성성분, 투여한 입자들의 물리적인 세포증식 장애등에 의한 일시적인 현상으로 생각된다. 이와 같은 결과는세포의 수를 측정하여 세포증식률을 관찰한 결과 배양 3일째까지는 실험군이 대조군보다 세포의 수가 적었지만 7일째와 9일째에는 차이가 없는 관찰결과를 뒷받침해주고있다. Hou 등<sup>(50)</sup>은 치은섬유아세포와 치주인대섬유아세포를 immuno-histochemical technique과 cloning으로 연구하여 치주인대섬유아세포의 세포의 기질 물질의 생성능력은 세포의 증식속도나 모양과 관련이 없고 유전적으로 결정된다고 하여 이 실험에서 나타난 이식재에 의한 DNA 합성 억제와 동반된 정상적인 단백질 합성의 현상을 설명 할 수 있다. 이식재입자

와 함께 치주인대섬유아세포를 30일간 장기배양결과 실험군에서 대조군에 비하여 다량의 석회화결절이 형성됨을 보여 치주인대섬유아세포가 조골세포의 특징을 가지고 있음을 보여주었고 두이식재가 신생골형성에 도움이 될수 있을 것으로 추정되었다.

이번 실험을 통해 in vitro에서 치주조직 재생시기에 생체유리45S5와 천연산호 골이식재 입자가 치주인대섬유아세포에 주는 영향을 살펴본 결과, 치주인대섬유아세포는 두 이식재 입자를 포식할 수 있고 세포증식은 이식재입자에 의해 단기적으로는 억제되며 장기적으로는 영향받지 않았으며 세포분화가 일시적으로 역행하지만 조골세포의 특징을 발현하고 단백질 생성은 영향받지 않음을 알 수 있었다. 또 생체유리45S5와 천연산호 모두 생체독성이 미약하고 치주조직재생 효과가 유사할 것이라 추정되었다. 이러한 결과는 같은 조건에서 HA가 조골세포<sup>51)</sup>와 치주인대섬유아세포<sup>44)</sup>에 미치는 영향과 유사한 점이 있다. 그리고 생체유리45S5와 천연산호 예의한 치주인대섬유아세포의 조골세포적 특징의 발현이, 골전도성이 있지만 골유도성은 없는 두 이식재가 치주조직 재생시 신생골을 형성하는데 도움이 되는 요인이라고 생각된다. 그러나 생체내의 치주조직은 상처의 치유과정에서 간엽조직, 혈관조직, 염증세포 등 다양한 세포들이 존재하고 서로 복합적으로 상호관련성을 띄고 있으며, 구강세균과 관련된 여러 요소들이 치유작용을 방해하는 등 여러 변수가 있어 실험결과와 동일한 영향을 미칠수는 없을것이다. 이 연구에서는 두 이식재가 in vitro에서 치주인대섬유아세포에 대한 영향만 평가하였지만 두 이식재의 골재생 효과를 정확히 알기 위해서는 좀더 조절된 조건하에서의 in vivo 및 in vitro 연구가 필요하며 치은섬유아세포 및 조골세포에 대한 영향평가도 필요할 것으로 보인다.

## V. 결론

골대체물질인 생체유리45S5와 천연산호의 치주인대섬유아세포에 대한 생물학적변화를 관찰하기 위

하여 건강한 치아의 치주인대섬유아세포를 채취 배양하여 두 이식재입자의 투여에 의한 세포모양의 변화, 세포의 증식, DNA 생성, 단백질 생성, alkaline phosphatase 활성도변화 및 석회화결절 형성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 두이식재의 투여에 의해 광학현미경하의 세포모양의 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으며, 투여된 이식재 입자들은 치주인대섬유아세포에 잘 부착하여 있었다.
2. 투과전자현미경하의 관찰결과 치주인대섬유아세포들은 이 두가지 이식재입자를 포식하는 소견이 관찰되었고, 입자를 포식한 세포들의 세포내 미세구조는 정상세포의 세포내 미세구조와 뚜렷한 변화는 관찰할 수 없는 것으로 보아 생체유리45S5와 천연산호가 치주인대 섬유아세포에 대한 세포독성은 없었다.
3. ALPase 활성도측정결과, BG0.3군을 제외한 나머지 실험군에서 대조군에 비해 낮게 나타났다.
4. 단백질 생성은 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었고 생체유리45S5와 천연산호간에도 유의성 있는 차이가 없었다.
5. DNA 합성 측정결과 배양 3일째까지는 대조군에 비해 모든 실험군에서 낮게 나타났으나 4일째에는 비슷하게 회복되었다. BG0.3군이 다른 실험군에 비해 DNA합성이 높게 나타났다.
6. 치주인대섬유아세포의 증식은 장기적으로는 생체유리45S5와 천연산호 입자의 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었다.
7. 이식재입자와 함께 치주인대섬유아세포의 장기배양결과(30일), 대조군에 비하여 다량의 석회화결절이 이들 이식재입자를 중심으로 형성됨이 관찰되었다.

이상의 결과로부터, 생체유리와 천연산호는 일시적으로는 치주인대섬유아세포에 대한 분화역행효과를 보이는 경향이 있으나, 이들 두 이식재입자의 치주인대 섬유아세포에 대한 직접적인 세포독성은 나

타내지 않는 것으로 보이며, 장기적으로는 이들 이식 재들이 치주인대섬유아세포에 의한 치주조직재생에 보조적인 역할을 할 수 있을것으로 추정된다.

## VI. 참고문헌

1. Froum, SJ, Thaler, R, Scoop, IW and Stahl, SS : Osseous autograft, clinical response to bone blend of bone marrow grafts, J. Periodontol, 46 : 515-521, 1975.
2. Alderman NE : Sterile plaster of paris as an implant in the infrabony environment : A preliminary study, J. Periodontol, 40 : 11-13, 1969.
3. Hodosh M, Povar M and Shklar G : Experimental findings of new bone formation after rat skull implants of polymethacrylate and an organic bone, : Plast Reconstr Surg 44 : 582-589, 1969.
4. Schallhorn RG : Postoperative problems associated with iliac transplants, J. Periodontol 43 : 3-9, 1972.
5. Jeffrey PF, Abram IC, John D and Michael CA : Preserved scleral allografts in periodontal defects in man, J. Periodontol, 48 : 4-12, 1977.
6. Robert GS : Present status of osseous grafting procedures, J. Periodontol, 48 : 570-576, 1977.
7. Michael AB and Mellonig JT : Bone grafts and periodontal regeneration, Periodontology 2000, 1 : 80-91, 1993.
8. Hydroxylapatite, beta tricalcium phosphate and autogenous and allogenic bone for filling periodontal defects, alveolar ridge augmentation and pulp capping, JADA, 108 : 822-829, 1984.
9. Drobeck HS, Rostein SS, Gumaer KI, Sherer AD and Slighter RG : Histologic observation of soft tissue response to implanted, multifaceted particles and discs of hydroxylapatite, J. Oral Maxillofac Surg, 42 : 143-149, 1984.
10. Barnett JD, Mellonig JT, Gray JL and Towle HJ : Comparison of freeze dried bone allograft and porous hydroxyapatite in human periodontal defects, J. Periodontol, 60 : 231-237, 1989.
11. Baldock WT, Hutchens LS, McFall WT and Simpson DM : An evaluation of tricalcium phosphate implants in human periodontal osseous defects of two patients, J. Periodontol, 56 : 1-7, 1985.
12. White E and Shore EC : Biomaterial aspects of interpore-200 porous hydroxyapatite, DCNA, 30 : 49-67, 1986.
13. Kenney EB, Lekovic V, Elbaz JJ, Kovacic K, Carranza FA and Takei H, : The use of a porous hydroxylapatite implant in periodontal defects, J. Periodontol, 59 : 67-72, 1988.
14. Frank RM, Klewansky P, Hemmerle J and Tenenbaum H, : Ultrastructural demonstration of the importance of crystal size of bio-ceramic powders implanted into human periodontal lesions, J. Clin Periodontol, 18 : 669-680, 1991.
15. Froum SJ, Weinberg MA, and Tarnow D, : Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of a clinical study, J. Periodontol, 69 : 698-709, 1998.
16. Yukna RA, : Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects, J. Periodontol 65 : 177-185, 1994.
17. Hench LL, : Biomaterials, Science, 208 : 826-831, 1980.
18. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, and Greenlee TK Jr, : Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, J. Biomed. Mater. Res. Sympo, 2 : 117-141, 1972.

19. Wilson J, and Nolletti D : Bonding of soft tissues to bioglass. Handbook of bioactive ceramics, Vol. I : 283-302, 1990.
20. Wilson J, Clark AE, Mathew H, and Hench LL. : Tissue response to bioglass endosseous ridge maintenance implants. J. Oral Implantol. 19 : 295-302, 1993.
21. Low SB, King C, and Krieger J. : An evaluation of bioactive ceramic in the treatment of periodontal osseous defects. Int. J. Periodont. Res. Dent. 17(4) : 359-367, 1996.
22. Wilson J, Low SB : Bioactive ceramics for periodontal treatment : comparative studies in the Patas monkey. Journal of Applied Biomaterials, 3 : 123-129, 1992.
23. Hench LL, Wilson J. : Surface-active biomaterials. Science, 226 : 630-636, 1984.
24. Schepers E, De Crege MA and Ducheyne P : Bioactive glass particulate as a filler for bone lesions. J. Oral Rehab. 18 : 439-452, 1991.
25. Schepers EJG, Ducheyne P : The application of bioactive glass particles of narrow size range as a filler material for bone lesions. : A 24 month animal experiment. Bioceramics, 6 : 401-404, 1993.
26. Schepers EJG, Ducheyne P, Barbier L, and Schepers S : Bioactive glass particles of narrow size range : A new material for the repair of bone defects. Implant Dent. 2 : 151-156, 1993.
27. Lee CW, Choi SM, Han SB, Park SH and Kim HJ : Histologic study of different bioceramic implants in intrabony defects. J. Korean Acad. Periodontol. 26 : 27-46, 1996.
28. Guillemin G, Patat JL, Fournie J, and Chetail M. : The use of coral as a bone graft substitute. J. Biomed. Mater. Res. 21 : 557-567, 1987.
29. Guillemin G, Meunier A, Dallant P, and Cristel P. Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. J. Biomed. Mater. Res. 23 : 765-779, 1989.
30. Lekovic V, Ouhaoum JP, Carranza FA, Nedic M, Bou Albboud N, and Kenny EB. : Histological and histometric evaluation of three graft materials in experimental osseous defects. J. Periodontol. 63 : Abstract No. 1009, 1992.
31. Issahakian S, Ouhaoum JP, Shabana H, and Sawaf H. : Evaluation of new biomaterial in periodontal defects : Natural coral. J. Dent. Res. 68(special issue) : Abstract No. 274, 1989.
32. Ouhaoum JP, Issahakian S, Patat JL, and Guillemin G. : Influence of biomaterials on the healing pattern of bony defects in miniature pig mandible. J. Dent. Res. 68(special issue) : Abstract No. 1244, 1989.
33. Shim JM, Son SH, and Han SB. : Clinical evaluation of coralline based porous hydroxyapatite and coralline based calcium carbonate in human intrabony periodontal lesions. J. Korean Acad Periodontol. 24 : 120-130, 1994.
34. Lee IK, Yi KY, Han SB, Ko JS and Cho JS : Effects of Bioceramic grafts with and without ePTFE membrane in periodontal osseous defects in dogs. J. Korean Acad Periodontol. 26 : 47-67, 1996.
35. Um HS, Han SB, Lee JI, Kim HJ, and Chang BS. : Immunohistochemical study on platelet-derived growth factor after implantation of different bone graft materials in intrabony defects. J. Korean Acad Periodontol. 27 : 45-59, 1997.
36. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, and Wennstrom J. : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. J. Clin Periodontol. 13 : 604-616, 1986.

37. Herr Y, Matsuura M, Lin WL, Genco RJ, and Cho MI : The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defect healing in the dog. *J. Periodont Res.* 66 : 716-730, 1995.
38. Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA. : Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J. Periodont Res.* 29 : 81-94, 1994.
39. Fetner AE, Hartigan MS, Low SB : periodontal repair using perioglas in nonhuman primates ; clinical histologic observation. *Compend. Cont. Educ. Dent.*, 15(7) : 932-938, 1994.
40. 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; 257-265, 1982.
41. Arceo N, Sauk JJ, Mochring J, Foster RA and Somermann MJ : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J. Periodontol.*, 62 : 499-503, 1991.
42. Yamashita Y, Sato M, and Noguchi T : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Archs. Oral Biol.*, 32 ; 677-678, 1987.
43. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahash N, Suda T, and Hasegawa K : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J. Periodontol. Res.*, 25 ; 179-185, 1990.
44. Alliot LB, De Lange GL, and Gregoire M : Effects of hydroxyapatite particles on periodontal ligament fibroblast-like cell behavior. *J. Periodontol.* 68 ; 158-165, 1997.
45. Matsuda N, Kumar NM, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, and Cho MI : Evidence for up-regulation of epidermal growth-factor receptor on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stimulation of phenotype in vitro. *Arch. Oral Biol.*, 38 ; 559-569, 1993.
46. Bellows CG, Aubin JE and Heersche JNM : Initiation and progression of mineralization of bone nodule formed in vitro. : The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral*, 14 ; 27-40, 1991.
47. Orly I, Gregoire M, Menanteau J, Heughebaert M, and Kerebel B : Chemical change in hydroxyapatite biomaterial under in vivo and in vitro biological conditions. *Calcif. Tissue Int.* 45 ; 20-26, 1989.
48. Alliot LB, Jean A, Gregoire M : Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. *Arch. Oral Biol.*, 39 ; 481-489, 1994.
49. Nohutcu RM, McCauley LK, Horton JE, Capen CC, Rosol TJ : Effects of hormones and cytokines on stimulation of adenylate cyclase on intracellular calcium concentration in human and canine periodontal-ligament fibroblasts. *Arch. Oral Biol.*, 38 ; 871-879, 1993.
50. Hou LT, Yaeger JA : Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblast. *J. Periodontol.* 64 ; 1209-1218, 1993.
51. Alliot LB, Gregoire M, Orly I, Menanteau J : Cellular activity of osteoblasts in the presence of hydroxyapatite : an in vitro experiment. *Biomaterials* 12 ; 752-755, 1991.

## 사진부도 설명

Figure 1. Phase contrast micrograph of control group at 4 days( $\times 132$ ).

The human periodontal ligament fibroblast(HPLF) were confluent, taking the form of a monolayer with no overlapping cells. The HPLF showed spindle or stellate morphology with prominent cytoplasmic processes and narrow intercellular spaces.

Figure 2. Phase contrast micrograph of BC0,3 group at 4 days( $\times 132$ ).

The HPLF showed similar morphology compared to control group. The particles of natural coral were observed in close contact with PDL cells and intercellular spaces. The particles, despite many washes, remained in contact with the HPLF, suggesting either adhesion or internalization of the particles.

Figure 3. Phase contrast micrograph of BC1,0 group at 4 days( $\times 132$ ).

The HPLF showed similar morphology compared to control group. The particles of natural coral were observed in close contact with HPLF and intercellular spaces.

Figure 4. Phase contrast micrograph of BG0,3 group at 4 days( $\times 132$ ).

The HPLF showed similar morphology compared to control group. The particles of bioactive glass were observed in close contact with HPLF and intercellular spaces.

Figure 5. Phase contrast micrograph of BG1,0 group at 4 days( $\times 132$ ).

The HPLF showed similar morphology compared to control group. The particles of bioactive glass were observed in close contact with HPLF and intercellular spaces.

Figure 6. Transmission electron micrograph of BG1,0 group at 6 days( $\times 15,000$ ).

The HPLF showed phagolysosomes containing the particles of bioactive glass(arrow) and many RER.

Figure 7. Transmission electron micrograph of BC0,3 group at 6 days( $\times 10,000$ ).

The HPLF showed internalization of the particles of natural coral(arrow) with many mitochondria and RER.

Figure 8. Transmission electron micrograph of BC1,0 group at 6 days( $\times 15,000$ ).

The particles of natural coral(arrow) were observed in close contact with the HPLF and the normal feature of cell organells were preserved.

Figure 9. Scanning electron micrograph of BG1,0 group at 6 days( $\times 3,000$ ).

The particles of bioactive glass(arrow) were attached to the HPLF.

Figure 10. Scanning electron micrograph of BC1,0 group at 6 days( $\times 3,000$ ).

The particles of natural coral(arrow) were overlapped by HPLF.

Figure 15. Light micrograph of control group at 4 days( $\times 10$ , Arizalin red stain).

There were no mineralized nodules.

Figure 16. Light micrograph of control group at 30 days( $\times 10$ , Arizalin red stain).

A little mineralized nodules(arrow) were observed.

Figure 17. Light micrograph of BG0,3 group at 4 days( $\times 10$ , Arizalin red stain).

The particles of bioactive glass (arrow) were observed.

Figure 18. Light micrograph of BG0,3 group at 30 days ( $\times 10$ , Arizalin red stain).

The mineralized nodules were observed around the particles of bioactive glass (arrow).

Figure 19. Light micrograph of BG1,0 group at 4 days ( $\times 10$ , Arizalin red stain).

The particles of bioactive glass (arrow) were observed.

Figure 20. Light micrograph of BG1,0 group at 30 days ( $\times 10$ , Arizalin red stain).

The mineralized nodules were observed around the particles of bioactive glass (arrow).

Figure 21. Light micrograph of BC0,3 group at 4 days ( $\times 10$ , Arizalin red stain).

The particles of natural coral (arrow) were observed.

Figure 22. Light micrograph of BC0,3 group at 30 days ( $\times 10$ , Arizalin red stain).

The mineralized nodules were observed around the particles of natural coral (arrow).

Figure 23. Light micrograph of BC1,0 group at 4 days ( $\times 10$ , Arizalin red stain).

The particles of natural coral (arrow) were observed.

Figure 24. Light micrograph of BC1,0 group at 30 days ( $\times 10$ , Arizalin red stain).

The mineralized nodules were observed around the particles of natural coral (arrow).



# 사진부도(1)

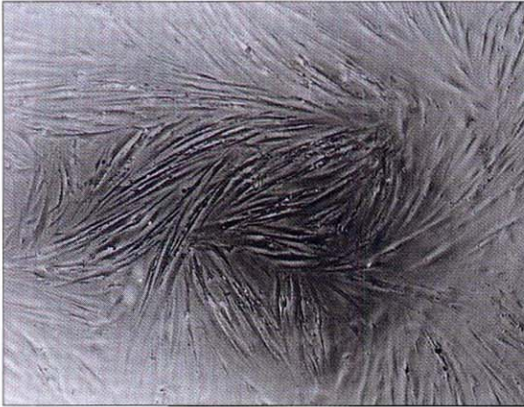


Figure 1

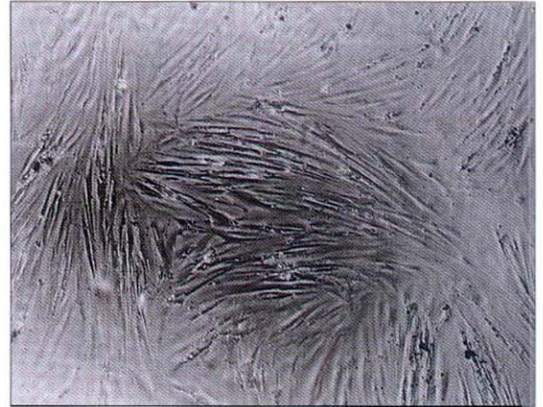


Figure 2



Figure 3

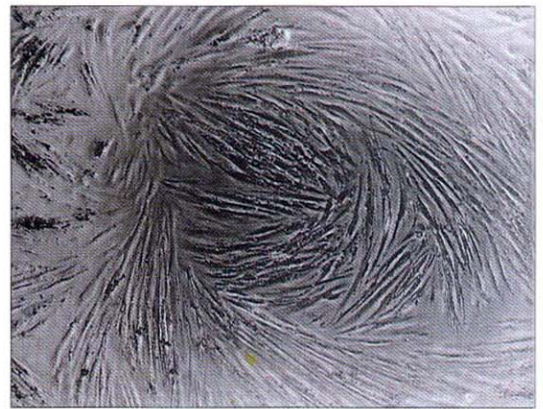


Figure 4

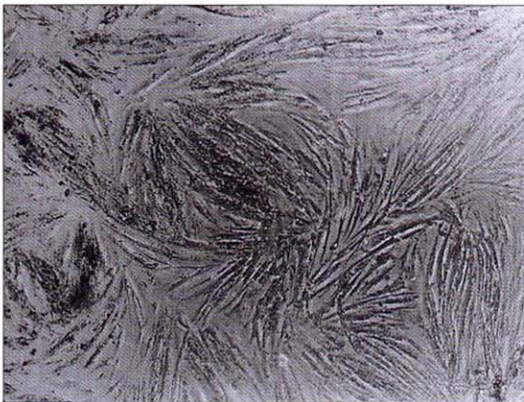


Figure 5

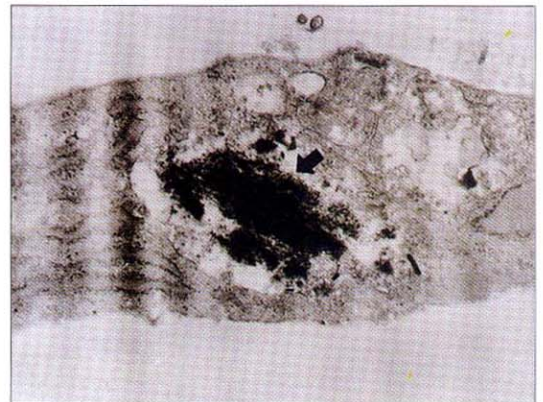


Figure 6



## 사진부도(Ⅱ)

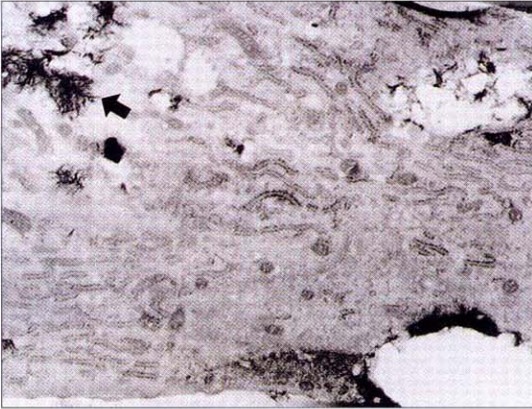


Figure 7



Figure 8

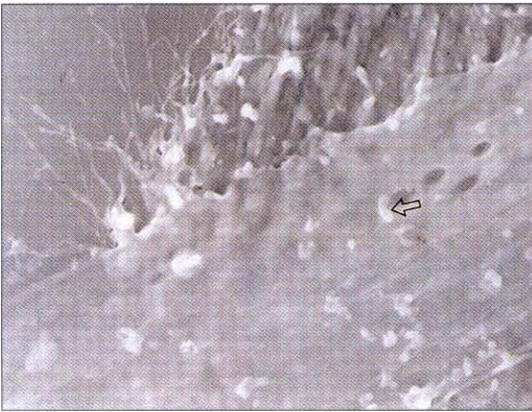


Figure 9

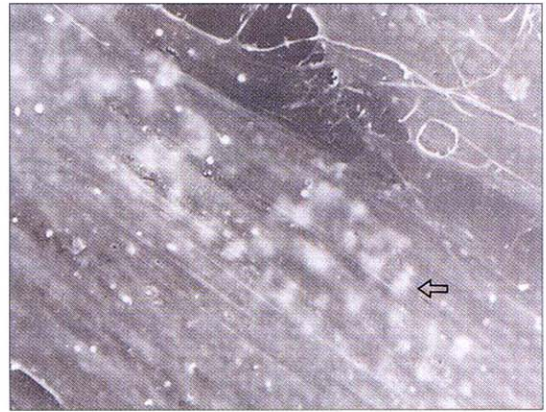


Figure 10

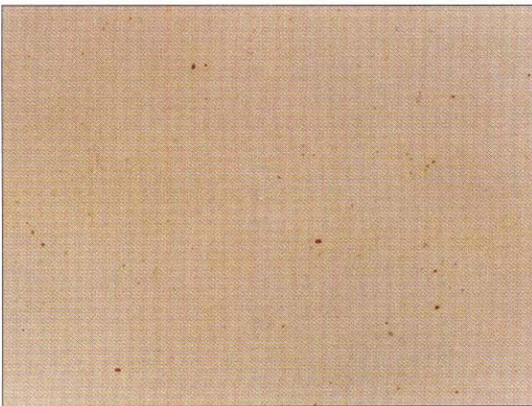


Figure 15

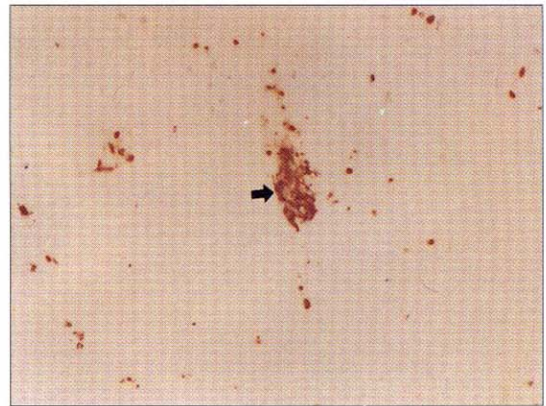


Figure 16



### 사진부도(Ⅲ)

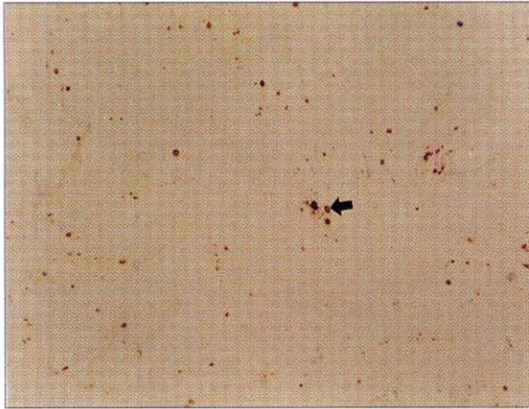


Figure 17

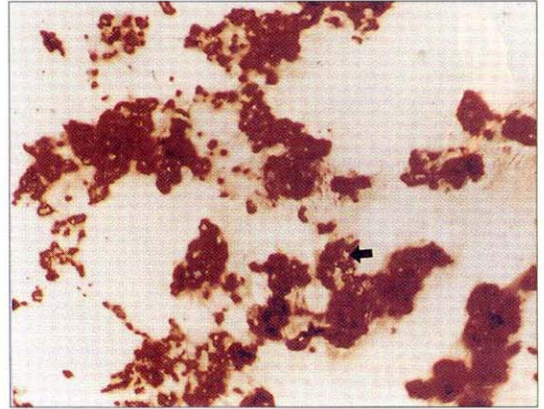


Figure 18

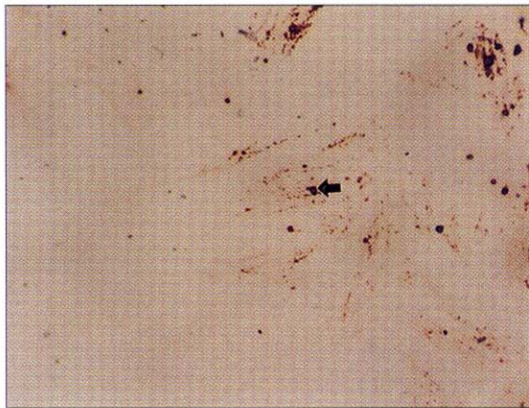


Figure 19

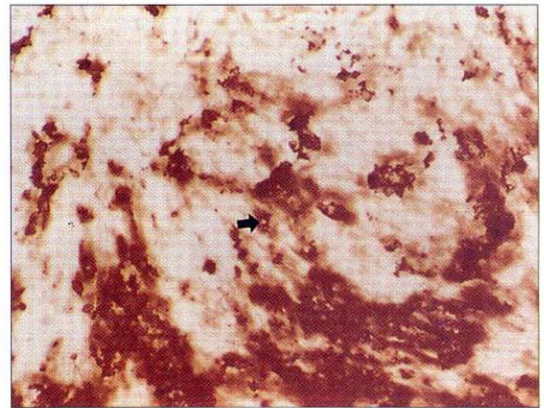


Figure 20

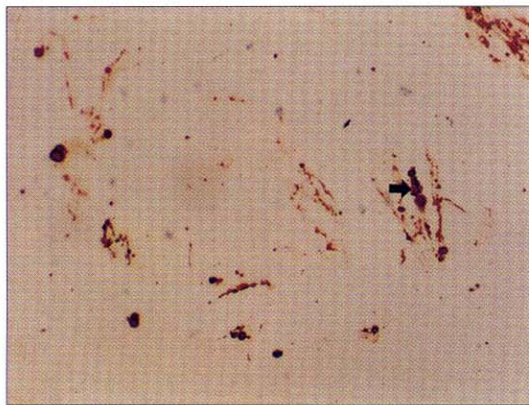


Figure 21

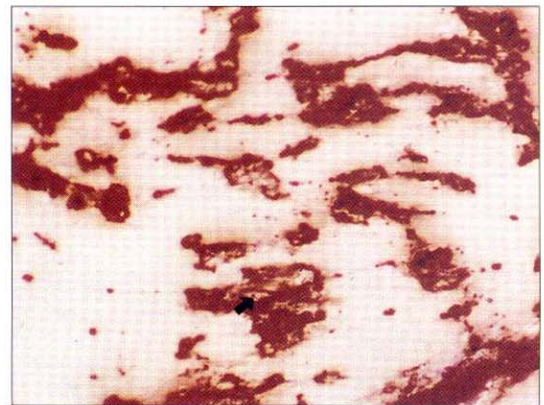


Figure 22

#### 사진부도(Ⅳ)

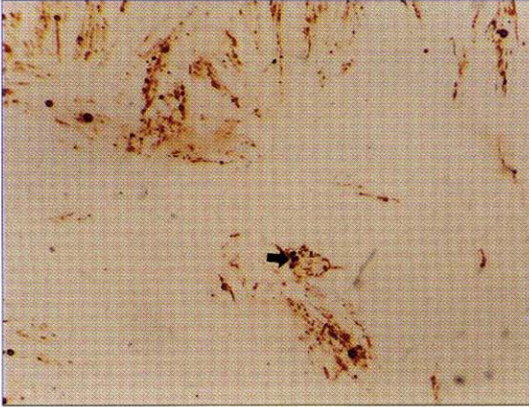


Figure 23



Figure 24

## Biological Effects of bioactive glass and natural coral on periodontal ligament fibroblast-like cell behavior

Sung-Kyu Shim, Soo-Boo Han

Department of Periodontology, School of Dentistry, Seoul National University

The purpose of this study was to evaluate the effects of bioactive glass and natural coral on the human periodontal ligament fibroblast(HPLF) behaviors during the regeneration process of periodontium. To determine the cellular events occurring in the presence of the particles of bioactive glass and natural coral, HPLF were isolated from healthy premolar teeth extracted for orthodontic treatment. Cells were cultured in  $\alpha$ -MEM at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity incubator. Bioactive glass and natural coral were powdered, and each particles( $<40\mu\text{m}$ ) were placed on the cultured cells at the concentration of 0.3mg/ml, and 1.0mg/ml for experimental group. In control group no particles were added. And each group was evaluated by examining the cell morphology under phase-contrast micrograph at 4 day and transmission electron micrograph(TEM) and scanning electron micrograph(SEM) at 14 day, alkaline phosphatase activity at 5 and 9 day, protein synthesis at 4 day, DNA synthesis at 1, 2, 3 and 4 day, cell proliferation at 1, 3, 5, 7 and 9 day and the formation of bone nodule at 30 day after culturing all groups in mineralizing supplemented medium. No significant changes in cell morphology by adding these two materials were found under phase contrast microscopy and TEM. HPLF phagocytocized each particles suggesting that HPLF is involved in the process of resorbing each particles and that bioactive glass were more biocompatible than natural coral. The ALPase activity of bioactive glass 0.3 mg/ml was similar with control groups and all the rests of control groups were significantly low( $P<0.01$ ) indicating a transient dedifferentiation of HPLF in the presence of bioactive glass and natural coral particles. There were no significant differences of protein synthesis between all groups. The DNA synthesis in experimental groups were significantly lower than control groups at 1, 2 and 3 day ( $P<0.01$ ) but became similar to control groups at 4 day. Between control groups, the DNA synthesis in bioactive glass 0.3mg/ml group was significantly higher than other groups( $P<0.01$ ). Cell proliferation in natural coral 1.0mg/ml and bioactive glass 1.0mg/ml groups were significantly lower than control group at 3 day( $P<0.05$ ) and there were no differences at 5, 7, 9 day. There were more bone nodule formation in experimental groups than in control groups. In conclusion, these results indicated that bioactive glass and natural coral have some effects of a transient dedifferentiation on HPLF and regeneration of periodontal tissues, however any significant cytotoxic effect on HPLF by these two particles were not found.

---

Key words : periodontal ligament fibroblast; bioglass; natural coral; , ALPase activity; protein synthesis; DNA synthesis; bone nodule.