

## 배양 치조골모세포의 생물학적 특성에 관한 연구

이용배 · 이성진 · 유석주 · 김성윤 · 신계철 · 김현아 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

### I. 서론

전 인류의 구강 내에 발생하는 치주질환은 임상적으로 다양한 증상을 나타내며 치은 출혈과 종창, 치주낭의 형성 및 치조골의 파괴 등으로 치아 상실의 주된 원인이 되고 있다<sup>1)</sup>. 따라서 치주질환으로 파괴된 치주조직의 재생은 치주치료에 가장 중요하며 골 이식술<sup>2)</sup>, 치근면 처리술<sup>3)</sup>, 조직 유도 재생술<sup>4)</sup> 등과 같은 술식을 통하여 치주조직의 재생을 도모하고있다. 치주조직의 재생은 지지구조의 재생에 관여하는 다양한 세포형태에 의해 매우 복잡하게 이루어지며 이러한 세포형태는 상피세포, 골모세포, 치주인대세포, 치은결합조직의 섬유모세포를 포함한다.

최근에는 치주조직의 재생에 주로 관여하는 치주인대세포와 치은섬유모세포, 골모세포와 연관되어 이들 세포의 치주조직 재생 기전에 대한 관심이 모아지고 있다. 근래에 들어 세포 생물학의 발전은 Arnold와 Baram<sup>5)</sup> 이 치주인대세포배양에 처음으로 성공한 이래 치의학 분야에서도 생체실험과 병행하여 연구방법론과 정확한 기전들의 규명에 있어서 많은 기여를 하였다. Jacobsen과 Goldhaber<sup>6)</sup> 는 실험실상 연구에서 사람의 치은에서 얻어진 상피와 결합

조직이 골 흡수를 일으키며, 치은 구성 세포가 골 흡수 활성인자를 분비한다고 하였으며, Piche<sup>7)</sup> 는 치은 섬유모세포, 치주인대세포, 치조골세포를 대상으로 각 세포의 형태, 성장 특성 및 생화학적인 차이를 연구한 바 있으며, Mariotti와 Cochran<sup>8)</sup> 는 치주인대세포와 치은섬유모세포의 증식속도에 대한 연구결과를 보고하였다. 골모세포는 단핵세포로서 교원질성 단백질과 비교원 골단백질(noncollagenous bone protein)로 구성된 유기기질인 유골(osteoid)을 합성하며, 골조직의 광화에도 관여한다. 골모세포는 다능성 간엽세포(multipotent mesenchymal cell), 또는 혈관주위세포(perivascular cell)에서 유래하며, 전구세포인 전골모세포(preosteoblast)를 거쳐서 골모세포로 분화되는 것으로 여겨진다. 치은과 치주인대의 결합조직에 존재하는 섬유모세포는 두 조직에서 가장 풍부한 세포성분으로 약 65-85%를 차지하며, 형태는 방추형이나 성상형이며 난원 형태의 핵을 갖고 잘 발달된 과립성 리보솜과 골지체, 미토콘드리아 등이 세포질 내에 포함되어있다. 섬유모세포는 다양한 형태의 결합조직을 합성하고 유지하며, 재생 및 형성 기전동안 조직의 구조화에 있어 형태를 유지하는데 도움을 주며 이들 세포는 구조 단백질의 합성을 통해

\* 이 논문은 2001학년도 원광대학교 숭산연구비 지원에 의해서 연구됨.

교신저자 : 신형식, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학 교실, 우편번호:570-749

상처치유에 관여하며 세포 외 기질의 재 조직화와 상처의 수축을 촉진시킨다<sup>9)</sup>.

본 연구는 치주질환으로 소실된 치조골 결손부와 임플란트 시술시 골 결손 부위의 골 이식 및 재생에 중요한 역할을 하는 골모세포를 건강한 사람의 치조골에서 분리 배양한 후, 세포 형태와 세포 증식, 세포 분화 정도 등과 같은 생물학적 특성을 치은섬유모세포 및 사람태아골모세포주를 사용하여 비교 분석하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

#### 1) 골모세포의 배양

본 연구에서는 원광대학교 치과병원 소아치과에 내원한 소아환자 중 매복치 발거에 이어 발치와에서 골편을 채취한 후 효소를 이용한 아래와 같은 세포 분리 방법을 통해 골모세포를 얻었다. 약술하면 채취한 골편을 PBS(Phosphated Buffered Saline, GibcoBRL, Grand island, NY, USA)속에서 잘게 썰고 세척하여 1-2mm<sup>3</sup> 크기의 조각을 0.1% collagenase(7500unit/ml, Sigma), 0.05% trypsin, 136.0mM NaCl, 2.6mM KCL, 0.36mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM EDTA를 함유한 효소 용액에 넣고 37℃ water bath에서 20분간 반응시키는 과정을 3회 반복하였다. 3회째의 반응에서 유리되어 나온 상층액을 동량의 cold FBS를 넣어 supernatant에서 더 이상의 효소작용이 진행되는 것을 막아주었다. 그 후 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GibcoBRL, Grand island, NY, USA)을 넣고 잘 섞은 후 1200rpm 에서 5분간 원심분리한 pellet을 한번 더 DMEM에 섞어 원심분리하여 세척하였다. 2번째의 원심분리에서 남은 침전물을 10% FBS를 함유한 DMEM으로 35-mm tissue dish에 2ml 씩 분주한 후 37℃의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub> 등의 표준배양상태를 계속 유지하면서 배양하였다. 세포가 증식하여 단일 밀생층 상태를 이루면 0.25% trypsin 용액을 사용하여 3-12 계대 세포배양을 시행하였다.

#### 2) 태아골모세포주의 배양

태아골모세포주(hFOB1 1,19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 10% fetal bovine serum(FBS : GIBCO/BRL, USA)과 0.03 mg/ml 의 G-418(Duchefa, Netherlands)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 HAM(DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, St. Louis, MO, USA) 2ml 이 담긴 6 well 배양접시에 well 당 5×10<sup>4</sup> 개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 이를 34℃의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub> 등의 표준배양상태를 계속 유지하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였으며 3-12 계대 세포배양을 시행하였다.

#### 3) 치은섬유모세포의 배양

치은섬유모세포는 원광대학교 치과병원 치주과에서 치관연장술을 위하여 절제된 건강한 치은으로부터 얻었다. 채취한 치은 조직은 PBS(Phosphated Buffered Saline, GibcoBRL, Grand island, NY, USA)로 3회 세척한 후 100mm 조직배양용 접시에 옮기고 15번 blade를 이용하여 10% fetal bovine serum(FBS : GibcoBRL, Grand island, NY, USA) 및 Penicillin 100unit/ml 와 Streptomycin 100μg/ml, Amphotericin B 25μg/ml 이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GibcoBRL, Grand island, NY, USA) 내에서 1 x 1 x 1 mm의 크기로 세절한 후 100mm 조직배양접시에 세절된 조직편 8-10개를 위치시켰다. 그 후 약 30분간 37℃, 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub> 등의 표준배양 조건하에서 배양한 후 각 배양접시당 10% fetal bovine serum(FBS : GibcoBRL, Grand island, NY, USA) 및 Penicillin 100unit/ml 와 Streptomycin 100μg/ml, Amphotericin B 25μg/ml 이 포함된 DMEM 3ml 씩을 첨가하고, 단일 밀생상태가 형성될 때까지 2-3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후 Trypsin -EDTA(0.05% Trypsin, 0.53 mM DETA, GibcoBRL, Grand island, NY, USA)를 이용하여 세포배양접시에 부착된 세포를 분리한 후 60mm 조직배양접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분

한 증식이 나타날 때까지 2-3일 간격으로 교환하여 3-12세대 세포배양을 시행하였다.

## 2. 연구 방법

### 1) 광학현미경적 관찰

각각의 세포는 이들 세포를 상기에 설명한 방법으로 배양하여 각각 3, 5, 7, 9, 11, 12 세대 배양 후 도립 현미경(Inverted Microscope, Olympus BH-S, Olympus, Japan)으로 관찰한 후 세포의 형태학적 특성을 기록하였다.

### 2) 세포 수 산정

배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA로 분리해 내었다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6 well plate에  $5 \times 10^4$  개의 세포수가 되도록 분주한 후 태아골모세포주는 24시간 동안 34℃의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하였고 골모세포와 치은섬유모세포는 37℃의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 24시간 동안 배양하였다. 약제처리 후 1, 3, 5일 동안 배양을 실시한 후 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 세포의 수를 계산하였다. 시간마다 각각의 그룹에서 3번 반복을 시행하였다.

### 3) MTT 분석

배양접시에서 배양된 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA 로 분리해 내었다. 혈구계수기로 세포 수를 세어 24-well plate에 각 well당  $2 \times 10^4$  개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 태아골모세포주는 24시간 동안 34℃의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하였고 골모세포와 치은섬유모세포는 37℃의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하였다. 그리고 24시간 후 부착되지 않은 세포들은 교환배지에 의해 제거되었다. 약제처리 후 1, 3, 5일 동안 배양한 후, MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma, USA) 용액

300  $\mu$ l 을 각각의 well 에 첨가되었으며 그 후 4시간 동안 배양되었다. 배양 후 배지를 제거하고 200  $\mu$ l 의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정의 용해를 위해 plate를 흔들었다. ELISA 분석기(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) 염기성 인산분해효소 측정

각각의 세포들을 6-well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층(mono layer)이 형성될 때까지 태아골모세포주는 24시간 동안 34℃의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하였고 골모세포와 치은섬유모세포는 24시간 동안 37℃의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하고 DMEM/F-12 1:1 Mixture, DMEM으로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture, 10% FBS, 1% 항생제(Penicillin G, 10,000 unit/ml, Amphotericin B 25  $\mu$ g/ml, GIBCO/BRL), 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10mM  $\beta$ glycerophosphate가 첨가된 DMEM에 실험군은  $10^{-7}$  M의 dexamethasone을 첨가하여 분주한 후 5일 동안 각각 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1,500 rpm에서 6분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1 ml에 0.1 M glycine NaOH buffer (pH 10.4) 0.2 ml, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate (p-NPP; Sigma, USA) 0.1 ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1 ml와 멸균된 증류수 0.1 ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37℃에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6 ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol (p-NP; Sigma, USA)을 기준으로 이용했다. 단백질 농도는 BCA protein assay

reagent (Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, bovine serum albumin을 standard로 하였고, 염기성 인산분해효소 활성도는 nM/30min/mg 으로 나타내었다.

#### 5) Western Blot 분석

상기의 방법으로 배양된 각각의 세포를 인산완충 용액으로 2회 세척한 후, lysis buffer로 세포단백질을 추출하고, BCA 용액(Bicinchoninic acid sol, Sigma, USA)에 Copper (II) sulfate(Sigma, USA)를 50 : 1로 혼합하여 단백질농도를 측정하였다. 각 실험군 별로 추출된 단백질 50  $\mu$ l씩을 사용하여 15% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel 전기영동을 시행한 후 PVDF (Immobilon™-P transfermembrane, Milipore Co., Bedford, MA, USA)에 옮겼다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온상태에서 membrane을 각각의 membrane blocking 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리한 후, Osteocalcin(Biogenesis, UK)과 Bone sialoprotein (Chemicon, CA, USA)을 각각 400 : 1로 blocking solution에 희석하여 90분간 반응시킨 후 blocking buffer로 2회 세척해내고, 2차 항체로 염기성 인산분해효소가 결합된 anti-mouse와 anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 실온에서 60 분 동안 반응시켰고, 인산 완충용액(1xPBS)으로 세척하였다. ECL 용액(Amersham, UK) A, B를 1:1로 혼합하여 반응시키고, Hyperfilm - MP (Amersham, UK)에 노출시켰고, 사용된 단백질이 동일한 양인지를 확인

하기 위하여 membrane을 1 x Ponceau S 용액(Sigma, USA)에 염색한 후 발현정도를 서로 비교하였다.

#### 6) 통계분석

실험결과와 분석은 SPSS WIN version 10.0을 사용하여 세포 증식과 염기성 인산분해효소 활성의 평균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적 차이는 일원 분산분석법(One-way ANOVA)을 이용하여 알아 보았다( $p < 0.05$ ).

### III. 연구결과

#### 1. 세포의 형태 변화

##### 1) 골모세포(primary explant cultured osteoblasts, PECO)

골모세포의 형태변화를 관찰하기 위하여 3-12계대 까지 배양한 결과 3 계대에서는 비슷한 모양의 소구 세포(small round cell) 또는 입방(cuboidal) 형태를 보이고 있었다(Figure 1). 계대 배양이 진행됨에 따라 점차로 성장(stellate) 혹은 수상돌기상(convoluted dendritic)의 경계를 갖춘 비교적 큰 다각형(polygonal)의 세포 형태를 보이다가 9계대째 24시간부터 세포간 경계가 불분명해지며 무정형(amorphous)의 형태를 보였다(Figure 2).



Figure 1. Primary explant cultured osteoblasts(PECO) of 3rd passage in culture(x100)

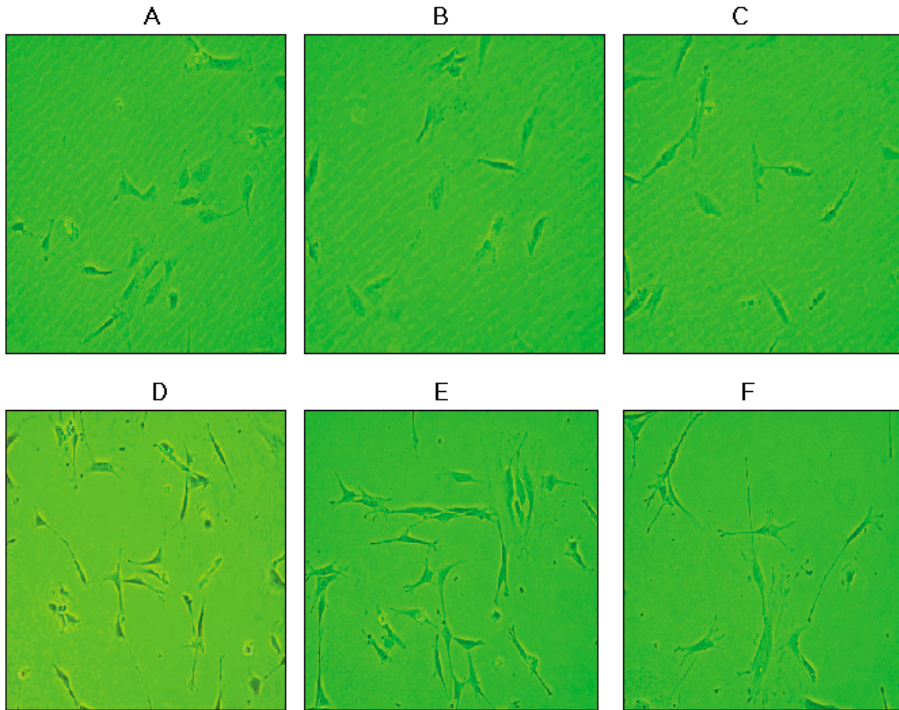


Figure 2. Photomicrographs showing morphological alteration of PECO. A, PECO of 3rd passage in culture(x100). B, PECO of 5th passage in culture(x100). C, PECO of 7th passage in culture(x100). D, PECO of 9th passage in culture(x100). E, PECO of 11th passage in culture(x100). F, PECO of 12th passage in culture(x100).

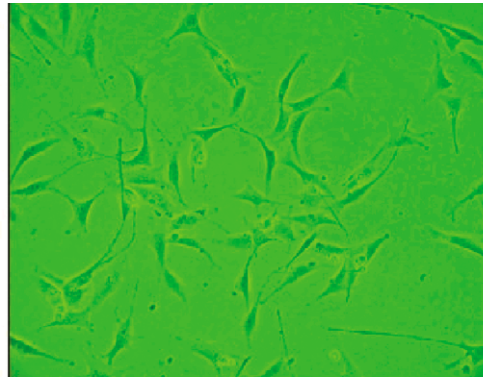


Figure 3. Human fetal osteoblast cell line(hFOB1) of 3rd passage in culture(x100)

## 2) 태아골모세포주

태아골모세포주의 형태변화를 관찰하기 위하여 3-12계대까지 배양을 시행한 결과 3계대 세포 배양에서는 골모세포와 거의 유사한 형태이나 골모세포에

비하여 세포돌기가 조금 더 신장된 형태가 관찰되었으며(Figure 3), 태아골모세포주에서는 계대배양에 따른 형태의 변화는 관찰되지 않았다(Figure 4).

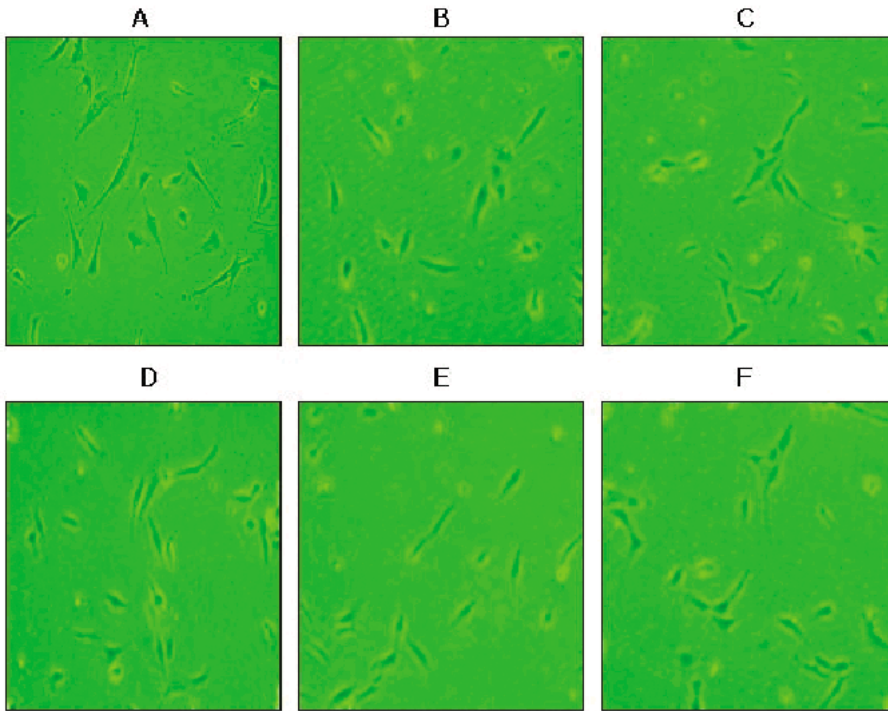


Figure 4. Photomicrographs showing morphological alteration of hFOB1. A, hFOB1 of 3rd passage in culture(x100). B, hFOB1 of 5th passage in culture(x100). C, hFOB1 of 7th passage in culture(x100). D, hFOB1 of 9th passage in culture(x100). E, hFOB1 of 11th passage in culture(x100). F, hFOB1 of 12th passage in culture(x100).

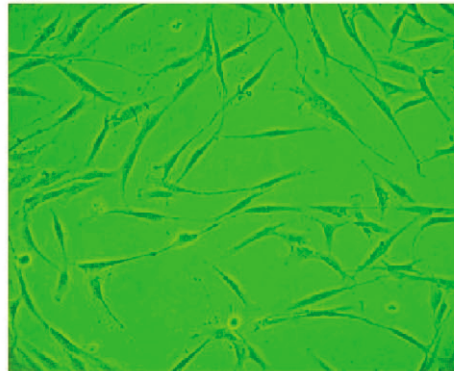


Figure 5. Gingival fibroblast of 3rd passage in culture(x100).

### 3) 치은섬유모세포

치은섬유모세포의 형태변화를 관찰하기 위하여 3-12계대까지 배양을 시행한 결과 3계대에서는 방추형 또는 전형적인 섬유모세포와 유사한 양상인 신장된

방추형 모양으로 세포돌기가 뚜렷하고 난원형의 핵이 관찰되었다(Figure 5). 계대 배양이 진행됨에 따라 11계대째 48시간 배양한 치은섬유모세포에서 노화가 시작되어 명확한 정상형 및 방추형의 모습이

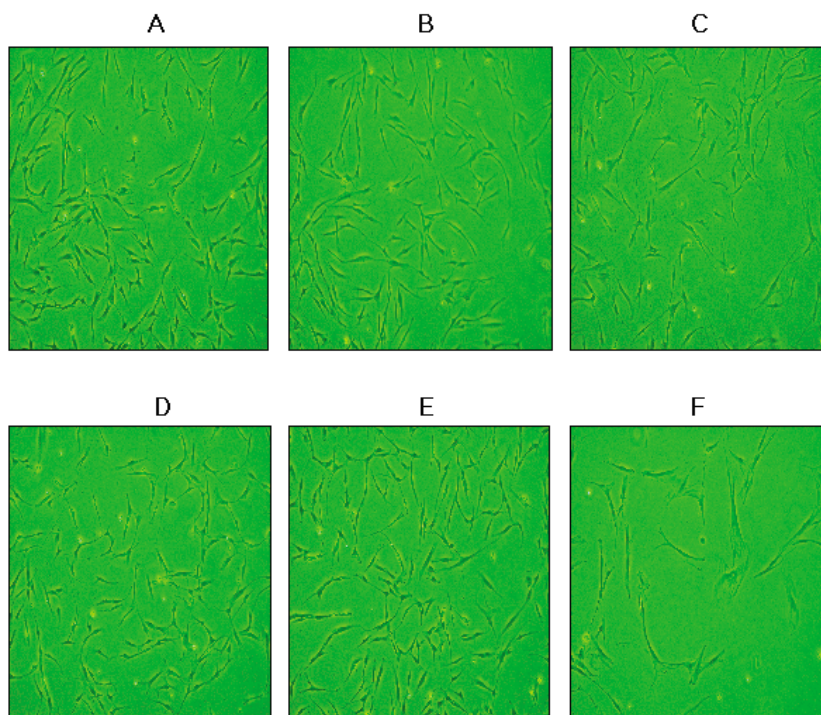


Figure 6. Photomicrographs showing morphological alteration of gingival fibroblasts, A. Gingival fibroblasts of 3rd passage in culture(x100), B. Gingival fibroblasts of 5th passage in culture(x100), C. Gingival fibroblasts of 7th passage in culture(x100), D. Gingival fibroblasts of 9th passage in culture(x100), E. Gingival fibroblasts of 11th passage in culture(x100), F. Gingival fibroblasts of 12th passage in culture(x100).

사라지면서 12계대째 배양에서는 난원형의 핵의 모습을 관찰하기 어려운 무정형의 치은섬유모세포가 관찰되었다(Figure 6).

## 2. 세포 증식

### 1) 세포 수 산정

골모세포와 태아골모세포주 및 치은섬유모세포를

Table 1. Cell number of PECO, hFOB1, and GF(Mean±S.D.)( $\times 10^4$ )

Day	PECO	hFOB1	GF
1	7.8±0.33	8.15±0.38	9.75±0.25 <sup>‡</sup>
3	11.47±1.06	12.75±0.23	15.9±0.31 <sup>*‡</sup>
5	15.43±0.63	16.83±0.29	21.17±1.23 <sup>*‡</sup>

<sup>‡</sup>: Statistically significant compared to PECO(p<0.05)

<sup>\*</sup>: Statistically significant compared to hFOB1(p<0.05)

PECO : primary explant cultured osteoblast

hFOB1 : human fetal osteoblast cell line

GF : Gingival fibroblast

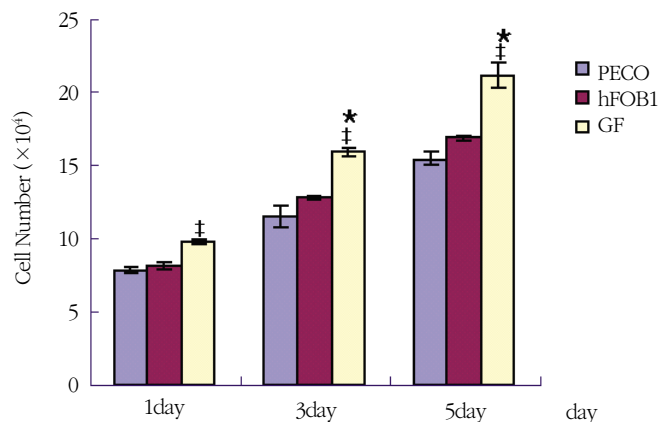


Figure 7, Cell number of PECO, hFOB1, and GF. Cell counting was performed after 1, 3, 5 days incubation. Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments. (‡ : Statistically significant compared to PECO(p <0,05) \* : Statistically significant compared to hFOB1(p <0,05), PECO : primary explant cultured osteoblast, hFOB1 : human fetal osteoblast cell line, GF : Gingival fibroblast)

Table 2, MTT assay of PECO, hFOB1, and GF(Mean±S.D.)

Day	PECO	hFOB1	GF
1	0,26±0,01	0,29±0,1	0,32±0,01
3	0,81±0,01	0,88±0,02	1,06±0,06 <sup>*‡</sup>
5	0,99±0,06	1,09±0,06	1,25±0,05 <sup>*‡</sup>

‡ : Statistically significant compared to PECO(p <0,05)

\* : Statistically significant compared to hFOB1(p <0,05)

PECO : primary explant cultured osteoblast

hFOB1 : human fetal osteoblast cell line

GF : Gingival fibroblast

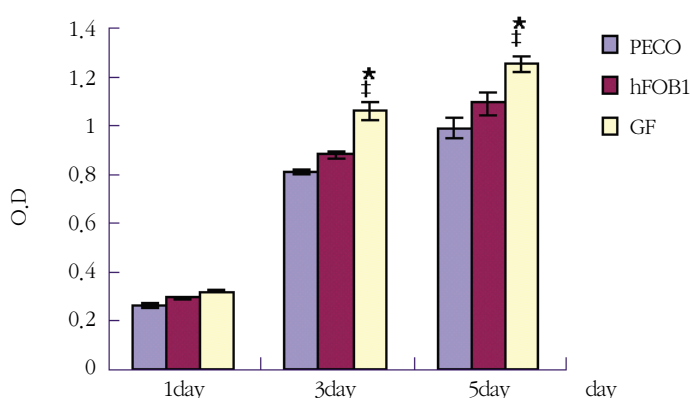


Figure 8, MTT assay of PECO, hFOB1, and GF. MTT assay was performed after 1, 3, 5 days incubation. Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments. (‡ : Statistically significant compared to PECO(p <0,05) \* : Statistically significant compared to hFOB1(p <0,05), PECO : primary explant cultured osteoblast, hFOB1 : human fetal osteoblast cell line, GF : Gingival fibroblast)

각각 1, 3, 5 일간 배양하여 살아있는 세포증식율을 비교 산정하였다. 실험결과에서 1일군에서 치은섬유모세포가 골모세포에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였고, 3일군과 5일군에서는 치은섬유모세포가 골모세포와 태아골모세포주에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였다. 골모세포는 태아골모세포주와 유의성이 없는 상태에서 비슷한 세포 수를 보여주었으며, 치은섬유모세포 보다는 유의하게 적은 수를 보여, 골모세포의 성장이 치은섬유모세포보다 확실히 느리다는 것을 알 수 있었다(Table 1, Figure 7).

## 2) MTT 분석

MTT를 이용한 세포활성도 검사에서는 골모세포와 태아골모세포주 및 치은섬유모세포를 각각 1, 3, 5 일간 배양하여 살아있는 세포성장률을 비교 측정하였다. 실험결과에서 3일군과 5일군에서 치은섬유

모세포는 골모세포와 태아골모세포주에 비하여 유의하게 더 증가된 활성을 보였으며, 모든 군에서 골모세포는 태아골모세포주에 비하여 더 낮은 활성을 보였으나 그 차이에 대한 유의성은 인정할 수 없었다(Table 2, Figure 8).

## 3. 염기성 인산분해효소의 측정

골모세포와 태아골모세포주 및 치은섬유모세포를 각각 5 일간 배양하여 ALP의 합성을 비교 측정하였다. 실험결과에서 골모세포와 태아골모세포는 치은섬유모세포에 비하여 모두 유의하게 높은 활성도가 나타났으며, 특히 골모세포는 태아골모세포에 비하여 유의하게 우세한 활성도가 나타나서, 세포주보다는 일차배양한 세포가 세포분화과정에 더 많은 영향을 준다는 것을 알 수 있었다(Table 3, Figure 9).

Table 3. Alkaline phosphatase activity of PECO, hFOB1, and GF(Mean±S.D.)

Day	PECO	hFOB1	GF
5	0.16±0.02	0.53±0.01*	0.62±0.01*†

\*: Statistically significant compared to PECO(p<0.05)

†: Statistically significant compared to hFOB1(p<0.05)

PECO : primary explant cultured osteoblast

hFOB1 : human fetal osteoblast cell line

GF : Gingival fibroblast

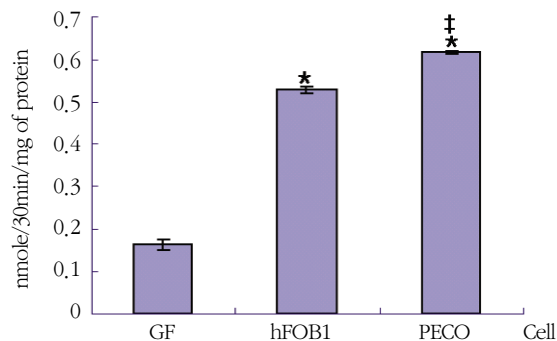


Figure 9. ALP activity of PECO, hFOB1, and GF. ALP activity was performed after 5 days incubation. Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments. (\* : Statistically significant compared to GF(p<0.05), †: Statistically significant compared to hFOB1(p<0.05), PECO : primary explant cultured osteoblast, hFOB1 : human fetal osteoblast cell line, GF : Gingival fibroblast)

## Osteocalcin

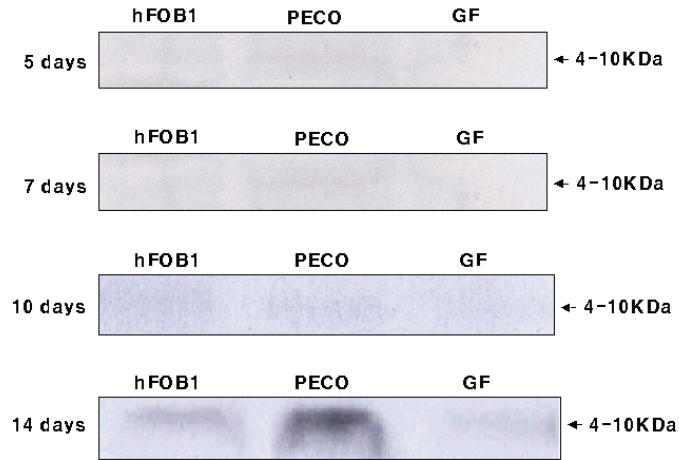


Figure 10. Osteocalcin expression by western blot analysis in hFOB1, PECO, and GF.( hFOB1 : human fetal osteoblast cell line, PECO : primary explant cultured osteoblast, GF : Gingival fibroblast)

### 4. Western blot 분석

#### 1) Osteocalcin 의 발현

골모세포와 태아골모세포주 및 치은섬유모세포에서 osteocalcin을 이용하여 Western blot을 시행하였다. 실험 결과에서 osteocalcin은 14일경에 골모세포에서 다른 세포에 비하여 뚜렷이 증가한 발현양상을

나타냈으며, 태아골모세포주에서도 치은섬유모세포에 비하여 약간 증가된 발현 양상을 나타냈다 (Figure 10).

#### 2) Bone sialoprotein(BSP) 의 발현

골모세포와 태아골모세포주 및 치은섬유모세포에서 BSP를 이용하여 western bolt을 시행하였다. 실험

## Bone sialoprotein



Figure 11. Bone sialoprotein expression by western blot analysis in hFOB1, PECO, and GF.( hFOB1 : human fetal osteoblast cell line, PECO : primary explant cultured osteoblast, GF : Gingival fibroblast)

결과에서 BSP의 발현은 14일경에 골모세포에서 다른 세포에 비하여 뚜렷이 증가한 발현 양상을 나타냈다(Figure 11).

#### IV. 총괄 및 고찰

치주조직은 치아를 악골내에 지지하는 치조골, 치조골과 치아를 연결하는 치주인대, 치주인대의 섬유를 함유하는 백악질, 치조골을 덮고있는 연조직인 치은 등으로 이루어져있으며 치주조직의 재생은 치은 섬유모세포, 치은결체조직세포, 골모세포, 치주인대 세포 등의 능력에 의해 제한된다. 최근에는 치은 섬유모세포와 골모세포의 유주, 분화 및 기능적 활성화를 유도할 수 있는 인자들의 개발 및 임상적 응용에 관련된 주제에 관심이 모아지고 있으며, 많은 연구자들이 치주조직의 재생을 이해하기 위하여 치유원이 되는 세포들에 대한 연구를 통해 조직 재생을 위한 가장 중요한 세포작용은 세포의 증식, 분화, 유주 및 대사과정에 있음을 이해하기 시작하였다.

치주결합조직의 주요 구성성분인 섬유모세포는 교원질과 세포외기질의 합성과 분해를 담당하며 골 흡수나 조직파괴를 자극할 수 있는 cytokine을 생성하므로 치주조직의 정상적인 대사, 치유 및 재생에 중요한 역할을 한다는 보고가 있다<sup>10</sup>. 특히 교원질과 연관된 섬유모세포의 형태의 변화는 세포증식의 감소와 관련하여 상처조직의 치유시 섬유모세포의 증식을 억제함으로써 상처조직의 크기를 작게 하는 결과를 나타낸다고 보고된바 있다<sup>11</sup>. 골모세포는 골 형성의 주된 세포 성분으로 또는 파골세포에 의한 골 흡수의 조절자로 작용하는 것으로 알려져 있으며<sup>12</sup>, 수명은 평균 3개월로 알려져 있으며 이중 50-70%가 세포자멸사(apoptosis)에 의해 소멸된다. 골모세포의 증식과 분화는 스테로이드 호르몬, 성 호르몬, 성장 호르몬 등이 영향을 미치는데 이때 호르몬은 특수 수용체를 경유하여 직접적으로 골모세포에 영향을 주거나 cytokine에 의하여 영향을 미칠 수 있다<sup>13</sup>. 본 연구에서는 일차배양된 골모세포를 사용하였는데 최근에는 이러한 세포의 배양은 생체 내에서 일어나는 생물학적인 현상을 연구하는데 있어 비교적

간편하면서도 중요한 수단으로 여겨지고 있다. 골모세포의 배양은 골의 대사 즉 골 형성 및 흡수, 골세포의 생성 및 분화 등의 연구뿐만 아니라 각종 호르몬이나 성장인자, cytokines 등이 골 대사에 미치는 효과 등을 알아보는데 있어 필수적이라 하겠다<sup>14</sup>. 골모세포의 배양은 1974년 Wong과 Cohn 등에 의하여 처음 시도된 이래 1985년 Robey와 Termine이 정상 사람의 골모세포를 성공적으로 배양시켰으며 Riggs 등은 정상사람의 골모세포에 estrogen receptor가 있음을 발표하였다<sup>15</sup>. 골모세포의 분리에는 어린 rat 나 mouse의 골 조직 특히 두정부 골(calvariae)이 가장 흔히 사용되며, 성공률도 높은 것으로 알려져 있으며, 이들 골 조직으로부터는 여러 가지 세포주가 확립되어있다. 이중 태생기의 mouse를 이용한 MMBI, MC3T3-E1 골모세포주와 태생기의 rat를 이용한 RCB, RCJ 세포주가 널리 사용되는 것들로 특히 MC3T3-E1은 기질에 무기질을 형성(mineralization of matrix)하는 성질도 가지고 있으며<sup>16</sup>, 본 연구에서는 일차배양한 골모세포 외에 골 기질 단백을 만들어 내고 광화시킬 수 있는 태아골모세포주(hFOB1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 사용하였다. 이미 확립된 세포주를 이용한 연구는 실험의 목적에 알맞은 각종 세포가 개발되어있어 입수가 용이하며, 배양시 안정성(stability) 및 영구 불변성(permanent cell line)과 같은 장점이 있는 반면에 배지의 환경 변화나 분화에 따른 골모세포의 발현양상의 변화나 성장인자의 분열 원질성 효과(mitogenic effect)등을 연구하는데는 부적절하다는 단점이 있다<sup>17</sup>.

본 연구에서는 각각의 세포에 대한 3-12 계대까지의 세포배양을 통한 세포의 형태변화를 관찰한 결과 골모세포에서는 3 계대 배양에서는 입방(cuboidal) 형태가 관찰되었으나 계대 배양이 진행됨에 따라 점차로 성상(stellate) 혹은 수상돌기상(convoluted dendritic)의 경계를 갖춘 세포 형태가 관찰되다가 9 계대 배양에서부터 세포가 노화되어 세포간 경계가 불분명해지며 무정형(amorphous)의 형태를 취하는 세포 형태 변화가 관찰되었다(Figure 1, 2). 태아골모세포주에서는 배양기간동안 세포 노화로 인한 형태

변화가 관찰되지 않았는데(Figure 3, 4), 이러한 실험 결과는 태아골모세포주가 세포 배양시 안정성과 영구 불변성과 같은 특성을 갖는다는 점을 고려하면 일반적인 세포 노화로 여겨진다. 그리고 치은섬유모세포에서는 3 계대 배양에서 방추형 또는 전형적인 섬유모세포와 유사한 양상인 신장된 방추형을 나타냈으나 계대 배양이 진행됨에 따라 11 계대 배양에서부터 치은섬유모세포가 노화되기 시작하여 명확한 성장형 및 방추형의 모습이 사라지는 것이 관찰되었고 12 계대 배양에서는 무정형한 형태의 치은섬유모세포가 관찰되었다(Figure 5, 6).

본 연구에서는 일차배양한 골모세포와 치은섬유모세포, 태아골모세포주(hFOB1)의 세포증식에 대한 차이를 관찰하였는데 치은섬유모세포가 가장 우세한 세포 증식양상을 나타냈으며 다음으로 태아골모세포주(hFOB1), 골모세포 순으로 세포증식 양상이 나타났다(Table 1, 2, Figure 7, 8). 치은섬유모세포가 골모세포에 비해 빠른 증식속도를 나타낸다는 본 실험 결과와 유사한 연구결과로는 김 등<sup>18)</sup> 이 치은섬유모세포의 증식속도가 골수세포의 증식속도보다 빠르다는 보고가 있으며, 또 다른 실험에서는 2배 증식 시간을 비교할 때 섬유모세포는 48시간이었으며, 골모세포는 120 시간이었다는 보고가 있다<sup>19)</sup>. 섬유모세포가 골모세포에 비해 더 우세한 증식양상은 파괴된 치주조직의 치유기전에 있어서 골모세포에 의한 골기질로의 치유보다는 섬유모세포에 의한 연조직 치유양상이 빈번하게 나타나는 것과 연관지어 생각해볼 수 있으며, 태아골모세포주가 일차배양한 골모세포보다 증식 속도가 빠른 양상은 통상의 세포주가 일차배양의 단점인 증식속도가 낮아 대량으로 세포를 이용하기 어려운 점을 개선한 것을 고려할 때 정상적인 세포증식 양상으로 사료되어진다. 일반적으로 배지에서 배양된 세포가 골모세포인지를 입증하기 위하여 다음과 같은 골모세포의 특성에 대한 기준이 있는데, 첫째 골기질 구성성분인 Alkaline phosphatase(ALP) 등과 같은 골과 관련된 물질의 분비여부, 둘째 특징적인 골 항상성 조절 호르몬에 대한 반응, 셋째 골 형성 유도 능력 등을 들 수 있다<sup>3)</sup>. ALP는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가

이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로써, 세포의 기질에 calcium phosphate를 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다<sup>20)</sup>. Qu 등<sup>21)</sup> 은 골모세포의 표지자로  $\alpha$ -1 collagen, ALP, osteocalcin, osteopontin 및 TGF- $\beta$ 1등을 들고있으며, ALP는 일반적으로 치주인대세포와 골모세포가 밀생 상태에 도달할 때까지 증가하며, 그 뒤에는 세포증식이 멈추고 세포는 분화에 들어간다. Gandolfi 등<sup>22)</sup> 은 ALP는 osteocalcin과 함께 골모세포의 기능과 성장에 비례하여 존재한다고 하였으며, Hui 등<sup>23)</sup> 은 ALP가 형성중인 치아 및 주위 치주인대에 많이 분포하며, 광화 과정에 중요한 역할을 하고 섬유모세포에 의한 교원질 탐식작용에 관여한다고 보고하였다. 본 연구에서 치은섬유모세포, 골모세포, 태아골모세포주의 ALP 활성을 측정 비교한 결과 치은섬유모세포에 비하여 태아골모세포와 골모세포 모두 유의하게 높은 활성도가 나타났으며, 또한 골모세포는 태아골모세포주에 비해서도 유의하게 우세한 활성도를 보였다(Table 3, Figure 9). 이러한 실험 결과는 사람에서 채득하여 일차배양한 골모세포에서 태아골모세포주나 치은섬유모세포에 비해 골모세포 본래의 특성이 잘 유지 발현되고 있는 것으로 사료된다. 그리고 골모세포와 태아골모세포주에 비해 적은 양이지만 치은섬유모세포에서도 ALP 활성이 관찰된다는 사실은 치은섬유모세포가 골모세포의 표현형을 갖을 수 있음을 유추할 수 있다. 이와 유사한 다른 실험 결과로 McCulloch와 Knowles<sup>24)</sup> 는 치은섬유모세포에서도 골모세포의 표현형이 포함되어 이질성을 가진다고 하였으며, Groeneveld 등<sup>25)</sup> 은 치주인대와 치간부 치은의 결합 조직에서 ALP의 활성이 관찰된다고 하였고 이는 치주인대세포와 치은의 내부에 존재하는 섬유모세포가 백악질 형성과 관련이 있다고 하였다. 또한 Carnes과 Maeder 등<sup>26)</sup> 은 치은의 기원세포도 잠정적으로 골모세포의 과정으로 분화할 수 있으며 적절한 환경에서는 치은섬유모세포가 in vitro에서 골양 조직을 형성할 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 각각의 세포에서 ALP와 더불어 또 다른 osteoblastic marker로서 인지되는 bone sialo-

protein과 osteocalcin의 발현 양상을 알아보기 위하여 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 사용하였다. 웨스턴 블롯팅(western blotting)은 여러 가지 단백질을 포함하고있는 세포 또는 조직의 추출물을 전기영동하여 그 속에 들어있는 단백질을 크기 별로 구분한 다음 흡착지에 옮겨놓고, 조사하고자 하는 단백질의 항체와 결합시켜 그 단백질의 존재유무와 크기 등을 밝히는 검사이다<sup>27-29)</sup>. PCR(Polymerase Chain Reaction)과 비교하여 단백질 검출의 민감도가 높으므로 어떤 단백질이 세포 속에 발현되고 있는가를 확인하거나 그 발현되는 단백질의 크기변화를 관찰하는데 이용된다. 본 연구 결과에서 bone sialoprotein의 발현은 14일경에 골모세포에서 다른 세포에 비하여 뚜렷이 증가하여 나타났으며, osteocalcin은 14일경에 골모세포에서 다른 세포에 비하여 뚜렷이 증가한 발현양상을 나타냈으며, 태아골모세포주에서도 치은섬유모세포에 비하여 약간 증가된 발현 양상을 나타냈는데(Figure 10, 11), osteocalcin과 bone sialoprotein은 골성 세포 분화의 단계에서 분비되는데, osteocalcin은 골 조직의 세포의 기질 단백질의 하나로 석회화 기전에 관여하는 것으로 여겨지며, bone sialoprotein은 백악질에서도 확인되며 백악질 형성에 중요한 기능을 할 것으로 여겨지고 있다<sup>30,31)</sup>. Collagen과 ALP가 초기 골세포 분화 단계에서 발현되고 후기 분화단계로 가면서 osteocalcin과 bone sialoprotein 등이 발현되는데<sup>32)</sup>, bone sialoprotein은 mineralization의 기시 과정에서 역할하는 것으로 알려져 있고 osteocalcin은 mineralization 초기 단계에서 crystal growth를 조절하는 기능을 담당할 것으로 여겨지고 있다.

따라서 이러한 단백질들이 치주조직 내에서 경조직 형성 능력을 가지며 골과 백악질을 재생할 수 있는 세포들의 지표물질이 될 수 있을 것으로 여겨지는데 본 실험에서 이러한 단백질들이 태아골모세포주나 치은섬유모세포에 비해 일차배양한 골모세포에서 뚜렷하게 증가되어 발현됐다는 점은 일차배양한 골모세포에서도 골모세포의 특성 기준중의 하나인 골 형성 유도능력을 많이 가지고 있는 것으로 사료되며, 따라서 골모세포의 성질을 연구하거나 외부

자극에 대한 골모세포의 반응을 연구하는데 있어 골모세포의 일차배양은 필수적이라 사료된다.

이상과 같은 연구 결과를 토대로 소실된 치조골의 재생에 있어서 중요한 역할을 하는 골모세포에 대해서 앞으로는 골 형성과 관련된 다양한 측정법을 사용하여 더욱 세밀한 연구가 이뤄져야 할 것이다. 그리고 각종 호르몬, cytokines, 성장인자 등 골 개조와 관련된 물질들과 골모세포 간의 상호작용 및 생물학적인 작용을 분석하기 위한 추가적인 연구가 이루어져 골 대사에 있어서 골모세포의 역할에 대한 심도 깊은 연구가 진행되어져야 할 것이다.

## V. 결론

본 연구는 소실된 치조골의 재생을 일으킬 수 있는 치조골모세포의 세포생물학적인 특성을 알아보기 위하여 세포 형태와 세포 증식, 세포 분화 정도 등을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포 형태의 관찰에서 치조골모세포는 9세대 배양 세포에서, 치은섬유모 세포는 11세대 배양 세포에서 노화가 시작되어 세포의 형태변화가 관찰되었으며, 태아골모세포주에서는 계대 배양 기간동안 노화로 인한 세포의 형태 변화가 관찰되지 않았다.
2. 세포 증식의 평가에서 세포수는 1일군에서는 치은섬유모세포가 치조골 모세포에 비해 유의하게 증가하였으며, 3일군과 5일군에서도 치조골 모 세포와 태아골모세포주에 비하여 유의하게 증가하였으며, 모든 군에서 치 조골모세포와 태아골 모 세포주 사이의 유의성은 없었다.( $p < 0.05$ )
3. 세포 증식의 평가에서 MTT 측정결과 3일군과 5일군에서 치조골모세포 와 태아골모세포주에 비하여 치은섬유모세포가 유의하게 가장 높은 세포활 성도를 나타냈으며, 모든 군에서 치조골 모세포와 태아골모세포주 사이의 유의성은 없었다.( $p < 0.05$ )
4. 염기성 인산분해효소 활성 평가에서 치은섬유

모세포에 비하여 태아골모세 포주와 치조골모 세포 모두 유의하게 높은 활성도를 나타냈으며, 치조골모 세포는 태아골모세포주에 비해서도 유의하게 높은 활성도를 나타냈다. ( $p < 0.05$ )

5. Western Blot 분석에서 bone sialoprotein의 발현은 치조골모세포에서 태아골모세포주와 치은섬유모세포에 비하여 뚜렷이 증가하여 나타났으며, osteocalcin의 발현은 치조골 모세포에서 태아골모세포주와 치은섬유모세 포에 비하여 뚜렷이 증가한 발현양상을 나타냈으며, 태아골 모세포주에서도 치은섬유모세포에 비하여 약간 증가된 발현 양상을 나타냈다.

이상과 같은 소견으로 배양한 치조골모세포는 태아골모세포주나 치은섬유모세포에 비해 세포수 및 세포성장의 증가는 미약했으나 골모세포의 특징이 되는 염기성인산분해효소 합성능에서 치은섬유모세포에 비해서 뚜렷한 차이가 나타났으며, osteocalcin과 bone sialoprotein과 같은 골 형성 단백질의 발현이 뚜렷하여, 치조골 재생 및 임플란트 수술시에 이러한 배양법을 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. 치주과학교수협의회 편저; 齒周科學, 군자출판사, 150, 1999.
2. Schallhorn R.G. and Hiatt W.H. ; Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal osseous defects. II. Clinical observations. J Periodontol 43, 67-81, 1972.
3. Cole R.T., Crigger M., Bogle G., Egelberg J., Selvic K.A. ; Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. J Periodont Res 15, 1-9, 1980.
4. 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.

5. Arnold L.F. and Baram P. ; In vitro culture of periodontal ligament cells. J Dent Res 51, 953-959, 1972.
6. Jacobsen N. and Goldhaber P. ; Bone resorption induced by epithelial and connective tissue from human gingiva in vitro. J Dent Res 51, 1683-1689, 1972.
7. Piche J.E., Canes D.L., Graves D.T. ; Characteristics of a non-fibroblast cell population derived from human periodontal ligament. J Dent Res 66, 356(Abstr No 1998), 1987.
8. Mariotti A. and Cochran D.L. ; Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. J Periodontol 61, 103-111, 1990.
9. 황성명 외 공역; 口腔組織學, (주)과학서적센터, 125, 1996.
10. Genco R.J. ; Host responses in periodontal disease : Current concepts. J Periodontol 63, 338-366, 1992.
11. Chiang T.M. ; Binding of chemotactic collagen-derived peptides to fibroblasts. : The relationship to fibroblast chemotaxis. J Clin Invest 62, 916-926, 1978.
12. Zheng M.H. ; What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation. Path Res Pract 188, 1104-1121, 1992.
13. Arceo N., Sauk J.J., Moehring J., Foster R.A., Somerman M.J. ; Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. J Periodontol 62, 499-503, 1991.
14. Centrella M., McCarthy T.L., Canalis E. ; Transforming Growth Factor B is a Bifunctional Regulator of Replication and Collagen Synthesis in Osteoblast-enriched Cell Cultures from Fetal Rat Bone. J Biol Chem 262, 2869-2877, 1987.
15. Robey P.G. and Termine J.D. ; Human bone cells. In vitro. Calcif Tissue Int 37, 453-460, 1985.
16. Brighton C.T., Strafford B., Gross S.B. ; The pro-

- liferative and Synthetic Response of Isolated Calvarial Bone Cells of Rats to Cyclic Biaxial Mechanical Strain. *J Bone and Joint Surg* 73, 320-331, 1991.
17. Colowick S.P. and Kaplan N.O. ; Methods in Enzymology. Academic Press 145, 303-334, 1987.
18. 김석용, 권영혁, 박준봉. ; 백서골수세포의 석회화과정에 미치는 치은 섬유 아세포의 영향. 대한치주과학회지 25, 210-221, 1995.
19. Hauachka P.V., Schwartz E.R. ; Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tissue Int* 37, 228-235, 1985.
20. Bellows C.G., Aubin J.E., Heershe N.M. : Initiation and proression of mineralization of bone nodules formed in vitro : The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* 14, 27-40, 1991.
21. Qu Q., Perala H.M., Kapanen A., Dahllund J., Salo J., Vaananen H.K.M. ; Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* 22, 201-209, 1998.
22. Gandolfi M.G., Pugnaroni A., Mattioli B.M., Zucchini P. ; Osteoblast behaviour in the presence of bisphosphonates : ultrastructural and biochemical in vitro studies. *Clin Exp Rheumatol* 17, 327-333, 1999.
23. Hui M.Z., Tenenbaum H.C., McCulloch C.A. ; Collagen phagocytosis and apoptosis are induced by high level alkaline phosphatase expression in rat fibroblast. *J Cell physiol* 172, 323-333, 1997.
24. McCullouch C.A. and Knowles G. ; Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodont Res* 26, 144-154, 1991.
25. Groeneveld M.C., Everts V., Beertsen W. ; Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar : Its relation to cementum formation. *J Dent Res* 74, 1374-1381, 1995.
26. Carnes D.L., Maeder C.I., Graves D.T. ; Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. *J Periodontol* 68, 701-707, 1997.
27. 이연태, 정원일. ; 유전자 공학, 집문당, 429-433, 1983.
28. 최영길. ; 임상 분자생물학 기법, 고려의학, 73-205, 1993.
29. Leonard G.D., Mark C.D., James F.B. ; Molecular biology, 311-314, 1986.
30. MacNeil R.L., Berry J., Strayhorn C., Piotrowski B. ; Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 33, 1-7, 1995.
31. Boskey A.L. ; Matrix proteins and mineralization; an overview. *Connect Tissue Res* 35, 357-363, 1996.
32. Yao K.L., Todescan R., Sodek J. ; Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res* 9, 231-240, 1994.

## Study on the Biological Characteristics of Cultured Osteoblasts Derived from Alveolar Bone

Yong-Bae Lee, Seong-Jin Lee, Suk-Joo You, Hyun-A Kim  
Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

Osteoblasts from alveolar bone may have an important role in the bone regeneration for periodontium, but their culture and characterization are not determined yet. The purpose of this study was to investigate the biological characteristics of primary explant cultured osteoblasts(PECO) from alveolar bone. Osteoblasts were isolated and cultured from alveolar socket of extracted tooth in children. To compare the characteristics, osteoblasts and gingival fibroblasts were cultured with DMEM at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% humidity incubator, and human fetal osteoblasts cell line(hFOB1) were cultured with DMEM at 34°C, 5%, CO<sub>2</sub>, 100% humidity incubator. To characterize the isolated bone cells, morphologic change, cell proliferation and differentiation were measured. Morphology of PECO was small round body or cuboidal shape on inverted microscope and was similar with hFOB1. PECO became polygonal shape with stellate and had an amorphous shape at 9th passage in culture. PECO had significantly higher activity than that of gingival fibroblasts and hFOB1 in alkaline phosphatase activity. The expression of osteocalcin and bone sialoprotein in PECO was notably increased when compared with hFOB1 and gingival fibroblasts. These result indicated that PECO from alveolar bone in children has an obvious characteristics of osteoblast, may be applied for the regeneration of bone.