

# 치주인대세포에 대한 Bone morphogenetic protein-7의 영향

김경희 · 김영준 · 정현주

전남대학교 치과대학 치주과학교실,  
전남대학교 의학연구소

## I. 서 론

치주치료의 궁극적인 목적은 질환에 의해 손상된 치주조직의 재생으로서, 치주질환 중 염증에 이환된 치근면의 신생 백악질의 형성, 신생골의 침착, 이 두 조직 간에 기능적으로 배열되는 신생 결합조직 섬유 및 상부 치은조직의 재형성을 의미한다. 그러나 치주 조직 치유시 치근백악질, 치주인대, 치조골 및 치은조직으로부터 유래되는 다양한 세포들의 영향으로 그 치유되는 양태가 매우 다르게 나타난다.<sup>1,2)</sup> 치주조직의 재생 과정 중 치주조직 내 특정 세포의 역할에 관해서 McCulloch<sup>3)</sup>와 Gould 등<sup>4)</sup>은 치주조직의 재생에 관여하는 전구세포들이 치주인대의 혈관주위에 존재한다고 하였고, Herr 등<sup>5)</sup>은 잔존하는 건강한 치주인대 부위의 세포활성을 통하여 치주조직의 재생이 얻어진다고 하는 등, 성공적인 치주조직의 재생을 위해서는 치주인대의 활성이 중요함을 시사하였다.

소실된 치주조직의 회복을 위해 여러 가지 방법으로 창상부분의 세포부착능력을 향상시키기 위한 치근면 처치제의 사용,<sup>6)</sup> 골결손부 재생을 위한 골이식재의 사용,<sup>7)</sup> 특정 세포의 선별적 이주를 이용하는

조직유도 재생술식<sup>8)</sup> 등이 있다. 그러나 현재까지 제안된 많은 방법들은 그 임상적 결과에 대한 예지성이 낮으며 특히 골재생 효과는 제한적이다.<sup>6-8)</sup>

최근에는 세포의 성상을 생물학적으로 조절하는 방법에 대한 연구가 진행되어 폴리펩타이드계 성장인자(polypeptide growth factors)와 골형태형성 단백질(bone morphogenetic protein; BMP)의 임상적용 가능성이 연구되고 있다.<sup>9,10)</sup> BMP는 1965년 Urist<sup>11)</sup>가 처음 발견하여 명명한 이래로 일반적인 특성, 아미노산 서열, 삼차원적 구조가 TGF- $\beta$ 와 유사성을 갖고 있으며 아미노산 서열의 유사성에 따라서 BMP-2/-4군, BMP-5/-6/-7/-8군, BMP-3/-12/-13군의 3개 소군으로 나누어지며 생체 내 여러 세포에 의해 합성되어 이량체 당단백의 형태로 존재한다.<sup>12,13)</sup>

BMP는 태생기 분화 및 신체골격 형성과 기관형성에 관여하며 태생기 이후에도 세포들의 생합성 및 연골모세포와 골모세포의 분화를 촉진시켜서 골형성을 유도한다.<sup>14,15)</sup> 여러 실험과 연구를 통하여 BMP의 골형성 유도능력이 평가되었는데, BMP-2/-4와 BMP-7군이 골 형성능력이 우수한 것으로 보고되고

교신저자 : 정현주, 광주시 동구 학동 5번지 전남대학교 치과대학, 치주과학교실, 우편번호: 501-757  
Email: jchung@jnu.ac.kr

있다.<sup>12-15)</sup> 성견에서 외과적으로 형성된 치조골 결손부에 BMP-2를 적용시 많은 양의 신생골과 백악질 형성이 보고되고 있으나<sup>16-19)</sup> 대부분의 경우 구강 내로 노출되지 않는 non-submerged defect type에서의 결과로 구강 내로 노출된 치주 결손부에서는 그 효과가 없었다.<sup>18)</sup> 그러나 BMP-7의 경우 어떠한 형태의 치주 결손부에서도 유의하게 많은 양의 치주 조직의 재생이 관찰되었다.<sup>20-22)</sup> 치주조직 재생에 성장인자나 골형태형성 단백질의 적용시 가장 큰 합병증중의 하나가 치근강직이다. BMP-2, BMP-4를 실험적 치주 결손부에 적용시 치근강직이 자주 관찰된다.<sup>16,17,19)</sup> 그러나 BMP-7을 적용한 경우는 치근강직의 빈도가 아무처치를 하지 않은 경우와 큰 차이가 없었다고 하였다.<sup>21,22)</sup> 이와 같이 치주 결손부에 다양한 BMP를 적용하였을 때 그 결과가 상이한 것은 BMP의 세포들에 대한 조절능력이 세포 및 분자 수준에서 다르기 때문으로 여겨진다.

지금까지의 연구결과로부터 BMP-7은 창상 치유과정 중에 세포이동과 기질형성을 촉진시키며 골형성을 증진시키는 효과가 있는 것으로 여겨진다. 따라서 BMP-7은 치주인대세포의 활성화를 통한 치주 질환으로 파괴된 치주조직의 재생에 유용한 제재 중 하나라고 시사되었다. 그러나 현재 BMP-7의 치주조직 재생에 대한 효과를 세포학적 수준에서 연구한 것은 드물다. 이에 이번 연구는 *in vitro* 상에서 BMP-7을 백서 치주인대 세포에 적용하였을 때 BMP-7에 의한 치주인대 세포의 생활성과 석회화 형성 능력을 관찰하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 백서 치주인대세포의 배양

백서의 치주인대세포는 Matsuda 등<sup>10)</sup>의 방법에 준하여 분리되었다. 치아 발거 전 5일 동안 0.4%  $\beta$ -aminopropionitrile(Sigma Chemical Co., U.S.A.) 수용액을 섭취시켰다. 실험동물에 pentobarbital sodium 30mg/kg을 복강 내 주사하

여 마취시킨 후 상악 좌, 우측 제 1 대구치를 발거하였다. 발거 1-2일 후 발치와 내의 혈병을 제거하여 세절한 다음 35mm 배양접시에 고르게 분산시켜 1% antibiotic-antimycotic solution(Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 세포를 배양하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 실험에는 계대배양 5-7세대의 것을 사용하였다.

### 2. 배양접시 내 BMP-7의 적용

Recombinant human bone morphogenetic protein-7(rhBMP-7)은 Dr. Higgins(State University of New York, School of Medicine, Buffalo)로부터 제공받았다. rhBMP-7은 배지에 녹여 stock solution으로 준비하였고 배지에 적용하였을 때 최종 농도가 각각 10, 25, 50, 100ng/ml이 되도록 하였다. 대조군은 rhBMP-7을 적용하지 않은 군을, 실험군은 해당 농도의 rhBMP-7을 적용한 군으로 하였다.

### 3. 세포활성도 검사

계대배양 5-7세대의 백서 치주인대 세포를 0.25% trypsin-EDTA(GibcoBRL, U.S.A.) 용액으로 처리하여 분리한 후 well당  $1 \times 10^4$ 개의 세포수가 되게 하여 96 well plate에 접종한 후 배양하였다. 세포가 약 70%정도의 밀생에 도달되었을 때 2% FBS가 포함된 DMEM(GibcoBRL, U.S.A.) 배양액으로 교환하고 해당농도의 rhBMP-7을 첨가하였다. 배양 1일 후와 3일 후에 MTT 검사를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit(Promega, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 지시대로 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide 용액 50 $\mu$ l를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 반응을 정지시키기 위하여 여기에 20 $\mu$ l의 10% SDS를 첨가한 후 ELISA plate read-

er(Microplate manager<sup>®</sup> BioRad, U.S.A)로 파장 490nm에서의 흡광도를 측정하였다. 해당농도의 rhBMP-7에 대한 세포활성도 평가는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

#### 4. 염기성 인산 분해 효소 활성도 측정

염기성 인산 분해 효소 활성도 측정은 Matsuda 등<sup>10)</sup>의 방법에 준하여 시행하였다. 백서 치주 인대세포를 배양한 후 12 well dish에 well당  $1 \times 10^5$  cell을 분주하였다. 24시간 후 해당 농도의 rhBMP-7을 적용하고 3일과 5일간 배양하였다. 배지를 제거한 후 1% TritonX-100으로 세포를 용해시키고 초음파로 분쇄시켰다. 0.4mM Tris HCl, 2mM  $MgCl_2$ , 4mM p-nitrophenol phosphate가 함유된 완충용액  $50 \mu\text{l}$ /well을 가한 후 30분간 반응시키고,  $150 \mu\text{l}$ 의 1N NaOH를 가하여 반응을 중지시킨 후 분해된 p-nitrophenol을 405nm에서 spectrophotometer로 비색 정량하였다.

#### 5. 석회화 결절 형성의 측정

석회화 결절 형성에 대한 rhBMP-7의 영향을 알아보기 위하여 백서 치주인대세포를 12 well plate에  $1 \times 10^5$  개의 세포가 되게 분주한 후 10% FBS,

1% antibiotic-antimycotic solution,  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbic acid, 10mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가된 DMEM 배양액에 rhBMP-7의 최종 농도가  $10 \text{ ng}/\text{ml}$ ,  $25 \text{ ng}/\text{ml}$ ,  $50 \text{ ng}/\text{ml}$ ,  $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하고 3일마다 배지를 교환하면서 14일간 배양하였다.

배양 14일 후에 세포를 4% formaldehyde에 1시간 고정한 후 1% alizarin red S 염색액을 넣어 20분간 반응시켜 석회화 결절을 염색하였다. 염색된 표본들은 CCD camera(Sony, Japan)에서 촬영하고 Optimas image-processing program(Media cybernetics, Carlsbad, CA, U.S.A)을 이용하여 모니터 상에서 석회화 결절 부분의 면적을 계측하였다.

#### 6. 통계학적 분석

모든 실험은 3회 시행하였으며 실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 Duncan 법을 시행하였다.

### III. 결 과

#### 1. BMP-7에 의한 백서 치주인대 세포의 활성도

대조군과 농도별로 BMP-7을 처리한 각 실험군

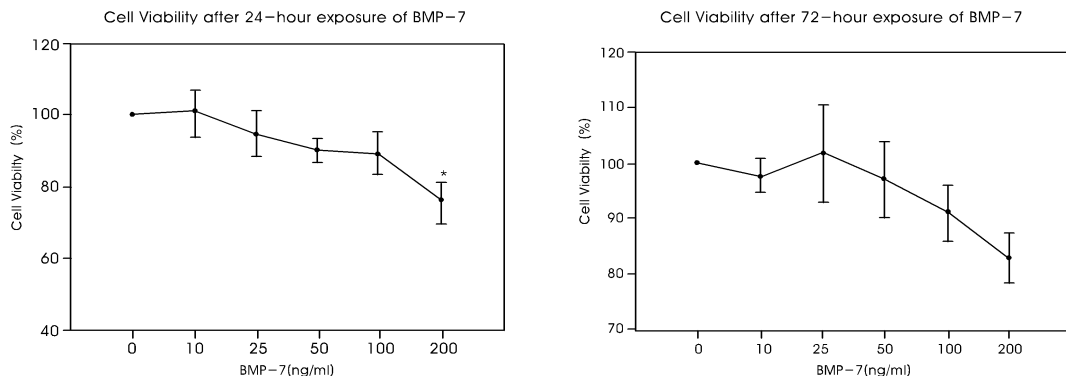


Figure 1. MTT assay for primary rat periodontal ligament cell viability with BMP-7(ng/ml). A: Cell viability after 24 hour exposure with BMP-7. B: Cell viability after 72 hour exposure with BMP-7. \*: indicates significant difference from the control group( $p < 0.01$ ).

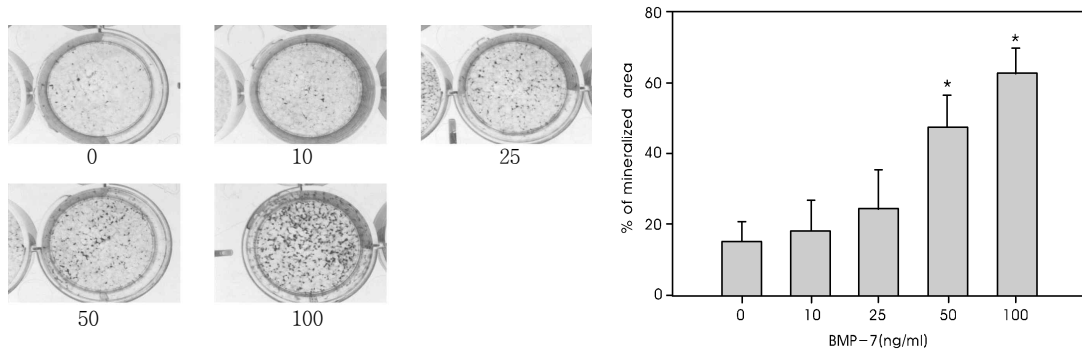


Figure 2. Representative *in vitro* mineralization data obtained from 14-day cultures of primary rat periodontal ligament cells. +: indicates significant difference from the control( $p<0.01$ ).

을 배양 1일, 3일 후에 MTT 검사를 시행하였다. 배양 1일, 3일 모두 BMP-7 농도 200ng/ml 이상에서는 대조군과 비교하여 유의한 활성 감소가 나타났다 ( $p<0.01$ , Figure 1).

## 2. 염기성 인산 분해 효소 활성도

BMP-7을 넣지 않은 대조군과 각 해당농도의 BMP-7을 첨가하고 배양한 실험군들의 염기성 인산 분해 효소 활성도를 측정하였다. 효소 활성도는 배양 3일에 대조군은 331 U였고, rhBMP-7 농도 10~100ng/ml에서는 320~415 U로 rhBMP-7 농도 50 ng/ml와 100ng/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도

가 유의하게 높게 나타났다(Table 1,  $p<0.05$ ).

배양 5일 후 효소활성도는 대조군은 513 U였고, rhBMP-7 농도 10~100ng/ml에서는 575~865 U로 모든 군에서 배양 3일에 비하여 효소 활성도가 증가하였다. BMP-7 농도 50~100ng/ml까지 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ , Table 1).

## 3. 석회화 결절 형성

백서 치주인대 세포를 석회화 결절 형성을 배지에 서 배양하고 배양 14일과 21일에 alizarin red S로 염색하고 석회화 결절 형성 면적을 측정하였다. 결

Table 1. Alkaline phosphatase activity(U/105 cells) of rat periodontal ligament cells treated with BMP-7

BMP(ng/ml )	Incubation periods	
	3 day	5 day
0	331 ± 98	513 ± 60
10	320 ± 38	575 ± 43
25	365 ± 31	628 ± 53
50	415 ± 55*	790 ± 66*
100	413 ± 64*	865 ± 91*

절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있었고 결절 중심부에 진한 적색으로 염색되어 있었다.

배양 14일에 대조군의 석회화 결절의 면적율은 15%, BMP-7 10ng/ml은 18.4%, 25ng/ml은 24.3%, 50 ng/ml은 47.6%, 100 ng/ml은 62.7%로 rh BMP-7 50ng/ml과 100ng/ml을 투여한 군에서 대조군보다 약 3~4배 더 크게 석회화 결절이 형성되었다( $p < 0.01$ , Figure 2).

#### IV. 고 찰

파괴된 치주조직의 수복에는 치은 섬유모세포, 치주인대세포, 그리고 골모세포가 주로 관여한다.<sup>1)</sup> 치근이 포함된 창상부위에 치은 섬유모세포에 의한 치유는 치근 흡수와 결합조직성 수복으로 이루어지고, 골모세포에 의한 치유는 치근강직과 골조직으로 수복된다. 그러나 치주인대 세포에 의한 치유는 백악질을 포함한 건강한 치주조직의 수복이 가능하며<sup>2,6,8)</sup> 이에 따라 치주 창상부위에 약제, 성장인자 및 골형태형성 단백질 등을 첨가하여 치주인대세포를 활성화시킴으로서 치주조직의 재생을 증진시키려는 연구가 진행되고 있다.

골형태형성 단백질은 골의 분화과정의 기시제로 작용하여 태생기 분화 및 구강악안면 조직을 포함한 신체골격 형성과 기관형성에 관여하며 태생기 이후에도 골이 형성되는 부위로 세포들의 이주와 부착, 그리고 연골모세포와 골모세포의 분화를 촉진시켜서 골형성을 유도한다.<sup>12-14)</sup>

Urist<sup>11)</sup>는 골형태형성 단백질은 미분화간엽세포를 자극하여 정상적인 골대사과정, 골절부위의 치유 및 이식골의 생착 등에 관여한다고 하였다. 골형태형성 단백질은 BMP-1을 제외하고는 아미노산 서열과 삼차원적인 구조가 TGF- $\beta$ 와 유사하여 TGF- $\beta$  superfamily로 분류되며 그 중 BMP-2, BMP-4 그리고 BMP-7이 골재생 능력이 우수하다고 평가되고 있다.<sup>14,15)</sup> BMP-2와 BMP-4는 낮은 농도에서도 우수한 골형성 능력과 치주조직 재생능력이 뛰어난 것으로 평가되지만, 실험모델에 따라서 재생능력

에는 차이가 있다. 또한 치근강직과 같은 부작용<sup>18,19)</sup>도 나타나기 때문에 다양한 치주 결손부위의 적용에는 좀더 많은 연구가 필요하리라 생각된다. BMP-7은 백서, 개, 원숭이 등의 여러 실험모델에서 우수한 치주조직 재생이 관찰되었으며 골강직도 관찰되지 않아 치주조직 재생에 유용한 물질로 평가되고 있다.<sup>20-22)</sup> 이러한 결과의 차이는 실험동물과 적용된 결손 모델 및 적용된 농도등의 차이에 의한 것으로 생각될 수 있지만 적용된 각 BMPs의 성분이 치주인대 세포에 미치는 영향에 차이도 있을 것으로 추정된다. 그러나 현재까지 BMPs의 세포수준에서의 연구는 주로 미분화된 전구세포나 골모세포에서 이루어져 왔다.<sup>14,15,23)</sup> 이에 이번 연구에서는 치주조직 재생에 중요한 역할을 하는 치주인대세포에 rhBMP-7을 적용하였을 때 치주인대세포에 의한 골 형성능력을 세포수준에서 관찰하였다.

BMP-7을 투여하였을 때 백서 치주인대 세포의 생활성 여부를 평가하기 위하여 MTT 검사를 시행하였다. MTT 검사는 살아있는 세포의 증식여부나 세포독성을 측정할 때 주로 많이 사용되고 있는 방법으로 세포의 수를 직접 세지는 않지만 대사적으로 활성을 가지고 있는 세포 내 미토콘드리아의 활성을 측정하여 세포의 생존여부를 정량적으로 측정하는 간접적인 방법이다. 대사과정이 온전한 세포에서는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 MTT tetrazolium이 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원되는데, MTT formazan의 흡광도는 490nm에서 최대가 되기 때문에 이 파장에서 측정된 흡광도는 생존하여 대사가 활발한 세포들의 수를 반영하게 된다. 따라서 측정된 흡광도를 통해 세포 수의 증식이나 감소를 간접적으로 알 수 있게 된다.<sup>24)</sup> 이 실험에서는 BMP-7의 투여농도에 따른 치주인대 세포의 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 BMP-7 10~200ng/ml을 투여한 군과 세포 배양액만 투여한 대조군의 경우와 비교하였다. 그 결과 세포배양 1일과 3일에 BMP-7 농도 10~100ng/ml 투여한 군과 대조군에서의 흡광도가 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으나 BMP

-7 농도 200ng/ml에서는 대조군에 비해 세포 활성이 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ , Figure 1). BMP가 세포의 증식 및 활성에 미치는 영향을 관찰한 여러 실험에서도 본 실험과 유사한 결과를 보고하였는데, Anusaksathien과 Giannovile<sup>25)</sup>은 BMP는 인간의 치주인대세포의 증식에 영향을 미치지 않았다고 하였고, Taira 등<sup>26)</sup>의 연구에서도 10 ng/ml 농도의 BMP는 백서 태아 두개관세포의 증식과 활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 세포활성에 영향을 미치지 않는 10~100ng/ml 농도를 선택하여 BMP-7에 의한 백서 치주인대세포의 석회화의 영향을 관찰하였다.

BMP-7은 전골모세포를 포함한 골원성 세포 혹은 근육세포가 골모세포로의 분화에 영향을 준다. 이들 대부분의 연구들은 골모세포 분화와 연관성이 있는 특정 표식자들 즉 염기성 인산분해효소 활성도, 석회화 결절 형성, 교원질 합성, osteopontin/osteonection, osteocalcin 등의 세포외기질 합성능력을 측정한다.<sup>37,28)</sup> 골원세포에서 골모세포로의 분화과정은 전골모세포에서 골모세포로 분화 초기에 제 1형 교원질, 염기성 인산분해효소의 생산이 증가된다. 그 이후 bone sialoprotein, osteopontin 등의 세포외기질 합성이 증가되고 골모세포의 광화가 시작되면 osteocalcin이 증가한다.<sup>28)</sup> 치주인대세포는 섬유모세포와 골모세포 유사 표현형을 가지고 있는데, 세포주위에 존재하는 여러 가지 cytokines이나 hormone에 의하여 세포의 특성이 변화될 수 있다.

이번 연구에서도 BMP-7에 의한 치주인대 세포의 성장변화를 관찰하기 위하여 염기성 인산분해효소 활성도와 석회화결절 형성율을 측정하였다. 이 연구에서 염기성 인산분해효소 활성도는 대조군에 비하여 그 수치가 더 높고 농도 의존적으로 증가하였다. 농도에 따른 변화를 관찰 시에 BMP-7 50 ng/ml과 100ng/ml 농도에서 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ , Table 1). 이 결과는 BMP-7 농도 2.5~80ng/ml에서 골모세포의 염기성 인산분해효소 활성이 농도 의존적으로 높게 나타났다는 Asahina 등<sup>29)</sup>의 보고와 BMP-7 100ng/ml

에서 대조군보다 더 높은 활성을 관찰한 Yeh 등<sup>30)</sup>의 보고와 유사하였다.

배양세포의 석회화 결절의 형성은 골조직 재생의 기본이 되는 석회화 능력을 나타내는 중요한 지표이다. 백서 장골의 골수에서 채취한 간엽세포를 대상으로 한 Notoya 등<sup>31,32)</sup>의 연구에 의하면 배양 14일 이후부터 석회화 결절이 형성된다고 보고하고 있는데 이 실험에서도 배양 14일 후 석회화 결절형성을 관찰하였다. 배양 14일후 BMP-7 10ng/ml과 25ng/ml 농도를 투여한 군에서는 대조군과 유의한 차이는 없었지만 더 높은 결절 형성율을 보였으며 BMP-7 50ng/ml과 100ng/ml 농도를 투여한 군에서 대조군에 비해 석회화 결절 형성 면적률이 약 3~4배 더 크게 나타났다( $p < 0.01$ , Figure 2). 백서 두개관세포를 대상으로 BMP-7 투여에 의한 석회화 결절 형성을 관찰한 Li 등<sup>33)</sup>의 연구에서도 100ng/ml 농도에서 대조군에 비해 약 3배 증가된 결절 형성을 보고하여 우리 연구의 결과와 유사하였다. 따라서 이 연구의 결과는 대부분의 치주인대 세포가 자극을 받지 않은 경우에는 골모세포와 유사한 특성을 갖는 세포로 분화되지 않거나 지연되지만, BMP-7 자극시에는 골모세포와 유사한 세포로 빠르게 분화되어 골형성이 증진됨을 시사한다.

이번 연구결과 백서 치주인대 세포에 BMP-7 농도 10~100ng/ml을 적용하였을 때, BMP-7은 세포의 활성을 억제시키지는 않았으며 염기성 인산 분해 효소활성을 농도 의존적으로 증진시킴을 알 수 있었다. 또한 rhBMP-7 농도 50ng/ml과 100ng/ml에서 석회화 결절 면적률이 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. 이는 BMP-7의 적용은 치주인대 세포의 골모세포 유사세포로의 분화에 영향을 주어 골 재생을 증진시킬 수 있음을 의미한다. 향후 BMP-7에 의한 치주인대 세포의 골모세포 유사세포로의 분화 과정에 영향을 미치는 신호전달체계에 대한 연구가 필요하며 또한 골형성에 중요한 세포외기질 단백질 분비에 미치는 영향 및 그 기전에 대한 연구가 필요하다.

## V. 결 론

이 연구는 recombinant human bone morphogenetic protein-7(rhBMP-7)이 치주 결손부의 조직재생을 증진시킨다는 연구보고에 근거하여 치주조직 재생에 가장 중요하다고 여겨지는 치주인대 세포에 BMP-7을 적용하였을 때 세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

백서 치주인대 세포에 BMP-7 농도 10, 25, 50, 100, 200ng/ml을 적용하고 배양 1일과 3일에 MTT 검사를 시행하였다. 또 BMP-7 농도 10, 25, 50, 100ng/ml을 치주인대 세포에 적용하고 3일과 5일 후 염기성 인산분해효소 활성도를 측정하였으며 배양 14일째 석회화 결정 형성 능력을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BMP-7 농도 10ng/ml~100ng/ml를 백서 치주인대 세포에 적용하였을 때 1일과 3일에 대조군과 유사한 세포활성을 보였으나, 농도 200ng/ml 이상에서는 세포 활성이 유의하게 감소하였다( $p<0.01$ ).
2. 배양 3일과 5일에 BMP-7을 처리한 경우에 염기성 인산 분해 효소 활성도는 대조군에 비하여 그 수치가 더 높고 농도 의존적으로 증가하였는데 BMP-7 농도 50ng/ml와 100ng/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높았다( $p<0.05$ ).
3. 석회화 결정 형성을 측정한 결과, BMP-7 농도 50ng/ml 과 100ng/ml에서 대조군과 비교하여 3~4배의 더 많은 석회화 결정을 형성하였다( $p<0.01$ ).

이상의 결과 BMP-7은 백서 치주인대 세포에 작용하여 골모세포 유사세포로의 분화를 유도하여 석회화를 증진하는 것으로 나타났으며, 치주질환에 의한 치조골 결손부의 재생에 BMP-7의 임상적 응용이 가능하리라 시사되었다.

## VI. 참고문헌

1. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissue. J Periodontol 1976; 47:256-260.
2. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC, Kock G. Progenitor cell kinetics during tissue regeneration in experimental periodontal wounds. J Periodont Res 23:107-117.
3. McCulloch CAG. Progenitor cell populations in periodontal ligament of mice. Anat rec 1985;211:258-262.
4. Gould TRL, Melcher AH, Brunette DM. Migration and division of progenitor cell populations in the periodontal ligament after wounding. J Periodont Res 1980; 15:20-42.
5. HerrY, Matsuda M, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. The origin of fibroblast and their role in the early stages of horizontal furcation defects healing in the beagle dogs. J Periodontol 1995;66:716-730.
6. McCulloch CAG, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. J Periodont Res 1991;26:144-154.
7. Mellonig JT, Bowers GM, Bright RW, Lawlence JJ. Clinical evaluation of freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. J Periodontol 1976; 47:125-131
8. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Noff M. Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs. J Pe-

- riodontal Res 1989;24:247-253.
9. Ripamonti U, Reddish AH. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenic proteins. J Periodont Res 1994;29:225-235.
10. Matsuda N, Kumar M, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Evidence for upregulation of epidermal growth factors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype in vitro. Arch Oral Biol. 1993;38:559-569.
11. Urist MR. Bone formation by autoinduction. Science 1965;150:893-899.
12. Lee MB. Bone morphogenic proteins: background and implications for oral reconstruction. A review. J Clin Periodontol 1997;24:355-365.
13. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenic proteins and Bone morphogenic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orth Rel Res 1998;346:26-37.
14. Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. Recombinant human bone morphogenic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cell. Endocrinology 1992;130:1318-1324.
15. Kim DJ, Moon SH, Kim H, Kwon UH, Park MS, Han KJ, Hahn SB, Lee HM. Bone morphogenic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. Spine. 2003;28:2679-2684.
16. Sigurdsson TJ, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ, Wikesjö UM. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. J Periodontol 1995;66:131-138.
17. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. J Dent Res. 1997;76:1460-1470.
18. Wikesjö UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, Jin L, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. J Clin Periodontol. 1999;26:392-400.
19. Wikesjö UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. J Clin Periodontol. 2003;30:705-714.
20. Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. Recombinant human osteogenic protein-1(OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. J Periodontol. 1998;69:129-137.
21. Rajshankar D, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Lekic PC. Osteogenic inhibition by rat periodontal ligament cells: modulation of bone morphogenic protein-7 activity in vivo. Cell Tissue Res. 1998;294:475-483.
22. King GN, Cochran DL. Factors that



- modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol*. 2002;73:925-36.
23. Chen TL, Shen WJ, Kraemer FB. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem*. 2001;82:187-199.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
25. Anusaksathien O, Giannobile WV. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Curr Pharmaceut Biotechnol*. 2002;3:129-139.
26. Taira M, Nakao H, Takahashi J, Araki Y. Effects of two growth factors and dexamethasone on the proliferation of rat bone marrow stromal cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Oral Rehabilitation*. 2003;30:697-701.
27. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biol Int* 1994;18:617-628.
28. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: Role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10:40-57.
29. Asahina I, Sampath TK, Hauschka PV. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 1996;222:38-47.
30. Yeh LC, Adamo ML, Olson MS, Lee JC. Osteogenic protein-1 and insulin-like growth factor I synergistically stimulate rat osteoblastic cell differentiation and proliferation. *Endocrinology*. 1997; 138: 4181-4190.
31. Notoya K, Tsukuda R, Yoshida K, Taketomi S. Stimulatory effect of ipriflavone on formation of bone-like tissue in rat bone marrow stromal cell culture. *Calcif Tissue Int* 1992;51:S16-20.
32. Notoya K, Yoshida K, Tsukuda R, Taketomi S. Effect of ipriflavone on expression of markers characteristic of the osteoblast phenotype in rat bone marrow stromal cell culture. *J Bone Miner Res* 1994;9:395-400.
33. Li WS, Cheifetz S, McCulloch CAG, Sampath K, Sodek J. Effects of osteogenic protein-1 on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cell are differentiation stage specific. *J Cell Physiol* 1996;169:115-125.

# Effect of BMP-7 on the rat periodontal ligament cell

Kyung-Hee Kim · Young-Jun Kim · Hyun-Ju Chung

Department of Periodontology, Dental Science Research Institute  
Chonnam National University

Bone morphogenetic protein-7(BMP-7), a member of the transforming growth factor superfamily, stimulates osteoblast differentiation and bone formation. There are lots of evidences supporting a direct participation of periodontal ligament(PDL) cells on periodontal tissue regeneration. The purpose of this study was to evaluate the effect of recombinant human(rh) BMP-7 on primary rat PDL cells in vitro, with special focus on the ability of bone formation. The PDL cells were cultured with rhBMP-7 at the concentration of 0, 10, 25, 50, 100 and 200ng/ml for MTT assay. We evaluated the alkaline phosphatase activity at 3 and 5 days of incubation and the ability to produce mineralized nodules of rat PDL cells at 14 days of cell culture in concentration of 0, 10, 25, 50 and 100ng/ml.

The cell activity was not reduced in cells treated with BMP-7 at 10~100ng/ml, whereas the cell activity was reduced in the concentration of 200ng/ml than the control at day 1 and 3( $p<0.01$ ).

At 3 and 5 day, alkaline phosphatase activity was significantly increased in cells treated with BMP-7 at 50ng/ml and 100ng/ml( $p<0.05$ ). The area of mineralized bone nodule was greater in cells treated with BMP-7 at 50 and 100 ng/ml than the control( $p<0.01$ ).

These results suggest that rhBMP-7 stimulate rat PDL cells to differentiate toward osteoblast phenotype and secretion of the extracellular matrix of rat PDL cells.

---

**Key words** : rat periodontal ligament cells, BMP-7, alkaline phosphatase, mineralized nodule