

치주인대 세포의 생물학적 특성

박귀운 · 신형식 · 유형근

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주조직의 재생이 일어나기 위해서는 적절한 조직 세포들이 창상 부위로 이동하여 부착이 일어난 후 계속해서 증식과 분화가 일어나고 경조직과 연조직의 결합조직과 같은 특수한 성분이 만들어져야 한다. 이러한 치주 조직의 재생을 위해서는 치주인대 세포의 능력과 역할이 가장 큰 것으로 여러 연구 결과 나타났으며^{1~7)}, 이러한 가능성은 치주조직 재생을 위한 임상 술식에도 많은 영향을 미쳤다. 특히 조직 유도 재생술은 치주 인대에서 유래되는 전구 세포들이 백악질과 치주 인대, 골 등과 같은 조직을 재생시킬 수 있는 능력을 가졌다는 이론을 전제로 하고 있기 때문에⁸⁾ 치주인대 세포의 특징을 규명하여 이와 같은 술식에 응용하는 것이 치주 질환 치료 전체에도 많은 영향을 미칠 것이다.

성공적인 치주 조직의 재생을 위해서는 치주인대 세포의 조골 유사세포 특성에 대한 더 많은 이해가 필요하겠는데, 어떤 세포들의 조골 유사세포 특성에 대한 기준으로는 1) 골 기질 구성 성분인 알칼리성 인산 효소 등과

같은 골과 관련된 물질의 분비 여부 2) 특징적인 골 항상성 조절 호르몬에 대한 반응; 예를 들어 부갑상선 호르몬에 대한 AMP 생성의 증가와 1,25 dihydroxyvitamin D₃에 대한 골 관련 호르몬의 합성 증가 3) 골 형성 유도 능력 등이 있겠다⁹⁾. 사람의 치주인대 세포를 특징지우기 위한 많은 연구들이 있었으나 각각의 연구들에서 조금씩 차이점들을 나타냈다. 1988년 Somerman 등¹⁰⁾은 동일 환자의 건강한 치은과 치주인대에서 섬유모세포를 분리 배양하여 여러 가지 생화학적 검사를 한 결과 치주인대 세포들이 치은 섬유모세포와 유의하게 다르다는 것을 알아냈는데, 즉 단백질과 교원질의 합성 정도와 알칼리성 인산 효소의 활성도가 많이 차이가 났다. 이전의 다른 연구^{11, 19)}에서도 치주인대 세포가 높은 알칼리성 인산효소 활성도를 가지고 있다고 하였으며, 1995년 Ogata 등은 배양 기간에 따른 두 세포의 비교에서도 둘 간에 많은 차이가 있다고 하여¹²⁾ 이들의 연구 결과로 볼 때 치주인대 세포가 조골 유사세포의 특징을 가지고 있다고 추측할 수 있겠다. 한편 치주인대 세포에 있어서 호르몬에 대한 cAMP의 반

* 이 논문은 1997년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 연구됨

응을 보면 Piche 등과 Roberts는 부갑상선 호르몬에 대해 cAMP의 수치가 증가한다고 하였으며^{13, 14)}, 반면에 Rao 등과 Somerman등은 부갑상선 호르몬에 대한 cAMP 반응의 변화를 볼 수 없다고 하였다^{15, 16)}. 그 외 호르몬에 대한 효과로는 1989년 Somerman등이 치주인대 세포에 있어서 PGE₂와 isoproterenol에 대한 cAMP의 반응이 변화가 있다고 하였으며, Rao(1978) 등도 PGE에 대한 반응에 있어서 cAMP의 수치가 증가한다고 하였다.

치주인대 세포가 골-관련 기질 구성 성분(bone-associated matrix constituents)인 bone sialoprotein I, osteonectin, biglycan 등과 같은 단백질을 생산해 내는지를 또한 알아보았는데, Somerman 등은 치주인대 세포들이 osteonectin을 생산해 내고 또한 osteonectin과 biglycan등에 대해 mRNA를 발현한다고 하였다¹⁶⁾. 그러나, 석회화의 조절에 있어서 골-관련 단백질의 정확한 역할에 대해서는 아직 정립되지 않은 상태이며 단지 골 항상성의 조절에 있어서 중요한 역할을 하리라 여겨질 뿐이다.

본 연구는 치주치료의 최종 목적인 백악질과 치조골 간의 치주조직 재생을 일으킬 수 있는 치주인대 세포를 치은 섬유모세포와 비교 분석하기 위해 두 세포들을 건강한 사람의 조직에서 분리 배양하여 각각의 세포생물학적 특성을 알아보기 위함이다.

II. 재료 및 방법

1. 치주인대 세포 및 치은 섬유모세포의 세포배양

본 실험에 사용된 치주인대 세포와 치은 섬유모세포는 원광대학교 치과병원에 내원한 환자중 교정 치료를 위해 발거된 소구치의 치은조직과 치주인대조직로부터 얻어졌다. 세척된 치아를 FBS(fetal bovine serum, Gibco

Co., USA) 10%와 항생제(Penicillin G 10,000 units/ml, Amphotericin B 25 μ g/ml, Gibco Co., USA) 1%가 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco Co., USA)이 들어 있는 100mm 조직배양 접시에 옮겨 No.15 blade를 사용하여 치주인대 세포 배양을 위해 치근 중간 1/3부위의 치주인대 조직을 큐렛으로 떼어낸 후 1mm²으로 세절하고, 치은 섬유모세포 배양을 위해 치근 상부에 있는 치은 조직을 떼어내어 1mm²으로 세절한 후, 60mm 배양 접시에 5~6개 조각을 고르게 분포시켰다. 약 30분간 37°C, 100%습도, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 DMEM 3ml를 첨가한다. 단일세포층이 형성될 때까지 2~3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 단층밀생이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후, 0.25% Trypsin/EDTA(1 \times , Gibco Co., USA)를 이용하여 세포배양 접시에 부착된 세포를 분리시킨 후 60mm 조직배양용 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 2~3일 간격으로 교환하였고 계대배양은 1:3~4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 4~8회 계대배양된 치은 섬유모세포와 치주인대 세포를 이용하였다.

2. 치주인대 세포 및 치은 섬유모세포의 세포 형태

치주인대 세포와 치은 섬유모세포의 형태는 이들 세포를 상기에 설명한 방법으로 배양하여 위상차 현미경으로 관찰한 후 세포의 형태를 촬영하였다.

3. 알칼리성 인산 효소 분석

치주인대 세포와 치은 섬유모세포를 60mm plate에 분주한 후 10% FBS와 항생제를 첨가

한 DMEM으로 2일 동안 37°C, 100%습도, 5% CO₂ 공기혼합배양기에서 배양하였고, cell 수는 1×10⁶이었다. 2일 후 배지를 제거한 후 trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1,500rpm으로 8분간 원심분리를 하였다. 상층액을 제거하고 0.5ml의 멸균된 증류수를 첨가한 후 현탁시켰다. 치주인대 세포와 치은 섬유모세포의 알칼리성 인산 효소 분석은 standard curve(0.00, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 μmole)을 표준지표로 하였으며, 각각의 세포 추출물 0.1ml, 0.1M Sodium citrate buffer (pH10.4) 0.2 ml, 15mM p-NPP 0.1ml, 0.1% Triton X-100/saline 0.1ml과 멸균된 증류수 0.1ml을 4°C에서 혼합하여 30분간 37°C에서 배양하고, 0.1N NaOH 2.5ml을 첨가하였다. Sample이 균일하게 잘 혼합되도록 한 후 spectrophotometer(Beckman DU-650, USA)로 410nm에서 판독하였다.

4. 교원질 합성량

치주인대 세포와 치은 섬유모세포의 총 교원질 양을 간접적으로 측정하기 위하여 hydroxyproline의 함량을 측정하였다. 각각의 세포내의 hydroxyproline의 측정은 Rojkind 등 (1979)의 방법을 변형하여 실시하였다. 각각의 세포를 1×10⁶의 세포수로 60mm plate에 분주한 후 2일동안 10% FBS와 항생제를 첨가한 DMEM으로 37°C, 100%습도, 5% CO₂ 공기혼합배양기에서 배양한 후 각 세포 별로 배양한 배지와 세포를 수거하였다. 배양 배지 내에 죽은 세포를 제거하기 위해 1,500rpm에서 5분 간 원심 분리한 후 10N HCl 3ml을 첨가하고, 각 세포는 trypsin-EDTA로 분리시켜 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 3ml 6N HCl을 첨가하였다. 110°C에서 10-24시간 가수분해 시킨 다음 각 시료를 여과하였다. 시료는 duplication하여 100 μl씩 취하였다. 완전히 건조시킨 다음 methanol 50 μl을 가하고 남아

있는 염산이 제거될 때까지 60°C에서 incubation하였다. 1.2ml 50% isopropanol을 넣어 남은 침전물을 용해하고, 200 μl chloramin-T 용액과 섞어 10분 간 방치하였다. 1.2ml의 Ehrlich 반응 시약을 넣어 섞은 후, 50°C에서 90분간 배양한 다음 상온에서 식힌다. 교원질 합성량 측정은 standard curve(0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5 μg/ml)을 표준 지표로 하여 558nm에서 흡광도를 spectrophotometer(Beckman DU-650, USA)로 측정하였다.

5. Immunocytochemistry

치주인대 세포와 치은 섬유모세포를 각각 5×10³세포로 24 well plate에 분주하여 2일간 배양하였다. 2일 후, osteonectin(150:1), osteocalcin(50:1), type I collagen(50:1)의 primary antibody를 희석하여 준비하였다. 배양한 세포로부터 배지를 제거하고 4% paraformaldehyde로 5분간 고정한 후 흡수화하기 위하여 100%, 100%, 90%, 80%, 70% ethanol을 순서대로 15-20초 동안 처리하고 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 내인성 peroxidase에 의한 artifact를 피하기 위하여 3% H₂O₂로 10분간 반응시킨 후, 위에서 준비한 희석된 primary antibody를 실온에서 1시간 동안 반응한 후 제거하였다. PBS로 5분간 3회 세척한 다음, linked antibody(anti-mouse IgG, Dako, USA)를 20분간 실온에서 반응시켰다. PBS로 5분간 3회 세척한 다음, streptavidine alkaline phosphatase로 20분간 반응시킨 후 PBS로 5분간 3회 세척하였다. aminoethyl carbazole(AEC)로 각 antibody별로 일정 시간 발색시킨 후 PBS로 5분간 3회 세척한 다음 현미경상에서 관찰하였다.

6. 통계처리

통계학적 유의성은 일원분산분석법

(ANOVA)를 이용하여 $P<0.05$ 수준에서 분석하였다.

III. 결 과

1. 세포 형태

치주인대 세포와 치은 섬유모세포의 형태는 그림 1, 2에서와 같이 관찰되었다. 세포를 분주하고 24시간이 지난 후 두 세포의 형태학적 차이는 별로 없었으며, 두 가지 세포 모두 방추형의 모습으로 세포 돌기가 뚜렷하고 잘 발달된 핵을 볼 수 있었다.

2. 알칼리성 인산 효소 분석

치주인대 세포와 치은 섬유모세포의 알칼리성 인산 효소 활성도를 측정한 결과는 표 1에 나타나 있다. 치주인대 세포의 알칼리성 인산 효소 활성도가 $0.82 \pm 0.01 (\mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cell})$ 로 $0.33 \pm 0.02 (\mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cell})$ 의 치은 섬유모세포 보다 훨씬 높게 나타났으며 두 세포간에 유의한 차이도 있었다($P<0.05$).

표 1 Alkaline phosphatase activity of cultured cells

Cell type	Mean \pm SD($\mu\text{mol}/\text{min}/10^6\text{cell}$)
Gingival fibroblast	0.33 ± 0.02
Periodontal ligament cell	0.82 ± 0.01

※ There is significant difference between two cells($P<0.05$).

3. 교원질 합성량

치주인대 세포와 치은 섬유모세포에서의 교원질 합성량은 표 2, 3와 같다. 2일 동안 배양한 세포에서 만들어진 교원질의 양은 치주인대 세포 $7.52 \pm 0.72\text{mg}/10^6$, 치은 섬유모세포 $6.37 \pm 0.37\text{mg}/10^6$ 로써 치주인대 세포가 약간

표 2 Collagen synthesis of cultured cells

Cell	Mean \pm SD($\text{mg}/10^6$)
Periodontal ligament cell	7.52 ± 0.72
Gingival fibroblast	6.37 ± 0.37

※ There is no significant difference between two cells($P<0.05$).

표 3 Collagen synthesis of cultured medium

	Mean \pm SD(mg/ml)
control medium	11.25 ± 0.90
Gingival fibroblast medium	11.51 ± 0.69
Periodontal ligament cell medium	11.67 ± 0.42

※ There is no significant difference between two cells from control ($P<0.05$).

더 많은 교원질을 만들어내는 것으로 보이나 두 세포간에 유의한 차이는 없었다($P<0.05$). 세포를 2일 동안 배양한 후의 배지를 가지고 교원질 합성을 측정한 결과는 치주인대 세포를 배양한 배지($11.67 \pm 0.42\text{mg}/\text{ml}$)와 치은 섬유모세포를 배양한 배지($11.51 \pm 0.69\text{mg}/\text{ml}$) 사이에 별다른 차이가 없었다. 이 두 배지는 대조군으로 사용한 배지와도 유의성 있는 차이가 없었다($P<0.05$).

4. Immunocytochemistry

치주인대 세포와 치은 섬유모세포를 2일간 배양한 후 고정하여, osteonectin, osteocalcin, type I collagen의 1차 항체로 면역세포화학적으로 본 결과는 그림 3-8에 있다. Osteonectin은 두 세포간에 세포질에서의 염색 정도가 비슷하거나 치주인대 세포에서 조금 더 발현이 되었으며 염색된 세포의 수에 있어서도 그 숫자가 비슷하였다(그림 3, 4). Osteocalcin은 치은 섬유모세포에서는 전혀 발현되지 않았으며 치주인대 세포에서만 발현되었으나

염색 정도가 진하지는 않았다(그림 5, 6). Type I collagen의 경우는 두 세포간에 전체적인 발현 세포의 숫자도 비슷하였으며 각 세포들내의 염색 정도도 서로 유사하였다(그림 7, 8).

IV. 총괄 및 고찰

치주 치료에 있어서 치주 조직의 재생은 가장 중요하고도 기본적인 목적이며, 치주조직의 재생에 있어서 치주인대 세포의 증식은 필수적이기 때문에 이 세포의 특징을 규명하여 그 결과를 임상적으로 응용하는 것이 바람직하다고 하겠다. 먼저 본 연구에서는 두 세포의 형태학적 차이를 관찰하였는데 세포분주 후 24시간이 지난 후의 형태는 커다란 차이가 없었다. 두 조직에서 분리 배양한 세포들은 모두 섬유모세포의 특징적인 형태인 잘 발달된 세포돌기를 가지는 방추형 모습이였다. 본 논문에서는 실험 결과를 제시하지 않았으나 예비 실험때에는 두 세포들이 완전 밀생 상태가 되었을 때의 형태도 비교하였는데, 밀생 상태가 된 후의 치은 섬유모세포는 일정한 방향으로 배열된 단층의 형태를 나타냈으며 치주인대 세포는 일정한 방향없이 배열되는 모습을 나타냈다. 이러한 결과는 이전의 연구 결과들^{10, 12, 13, 17)}과 일치하는 것으로써 치주인대 세포와 치은 섬유모세포는 밀생 상태에서만 형태학적 차이가 남을 알 수 있었다. 그러나 이들 연구에서 경우에 따라서는 치주인대 세포들이 골 세포와 유사하게 일정한 방향으로의 배열 없이 다방향적으로 다층의 밀생 상태를 보인다고 하였는데 이러한 차이는 치주인대 세포 자체의 계대수의 차이로 인한 분화 정도의 차이 때문인 것으로 여겨지며 앞으로의 연구에서는 계대수의 비교도 필요할 것으로 생각된다.

성공적인 치주 조직의 재생을 위해서는 치주인대 세포의 조골 유사세포 특성에 대한

더 많은 이해가 필요하겠는데, 어떤 세포들의 조골 유사세포 특성에 대한 기준으로는 1) 부갑상선 호르몬과 PGE₂, isoproterenol, calcitonin 등에 대한 cAMP 생성의 증가와 1,25 dihydroxyvitamin D₃에 대한 골 관련 호르몬의 합성 증가 2) 골 기질 구성 성분인 알칼리성 인산 효소 등과 같은 골과 관련된 물질의 분비 3) 골 형성 유도 능력 등이 있겠다⁹⁾. 골 유래 세포들은 섬유모세포에 비해 내인성 알칼리성 인산 효소의 수준이 매우 높으며, 일반적으로 부갑상선 호르몬의 자극에 의해 효소 활성도가 감소한다^{19~21)}. 또한 골 유래 세포들은 1,25 dihydroxyvitamin D₃에 의해 알칼리성 인산 효소의 수준이 상당히 증가한다^{22, 23)}. 두 세포에서 조골성 세포의 기준이 되는 알칼리성 인산 효소의 활성도를 비교한 결과 치주인대 세포에서 치은 섬유모 세포보다 높은 것으로 나타났는데 이는 이전의 연구 결과^{9, 10, 12, 13)}들과 동일한 것이다. 치주인대 세포에서 알칼리성 인산 효소가 증가한다는 것은 이 세포가 조골세포성 표현형을 나타낸다는 것을 알 수 있다. Ogata 등¹²⁾은 치주인대세포에서 높은 알칼리성 인산 효소 활성도와 함께 알칼리성 인산 효소의 mRNA 발현이 있음을 밝혀냈으며, Goseki 등²⁴⁾은 치주인대세포에서의 알칼리성 인산효소 cDNA의 전체 길이와 염기 서열을 알아냈다. 1991년 Arceo 등⁹⁾은 높은 알칼리성 인산 효소를 나타내는 치주인대 세포들이 낮은 수준의 알칼리성 인산 효소를 나타내는 치주인대 세포들에 비해 결절 형성 등의 석회화 정도가 빠르거나 증가하는 것은 아니라고 하여, 석회화를 촉진하는 다른 어떤 요소가 치주인대 세포에 존재할 수 있음을 추측하게 해주었으며, 또한 모든 치주인대 세포에서 석회화 기간 동안 알칼리성 인산 효소가 증가할 가능성이 있다고 하였다.

섬유모세포의 주 기능 중 하나는 세포외 기질 물질을 생산해 내는 것인데 본 연구는 교

원질 생성량이 두 세포에서 차이가 나는 지를 알아보기 위해 hydroxyproline을 이용한 전체 교원질의 합성량과 치은과 치주인대 조직 중 최대량을 차지하는 제 1교원질의 발현 차이를 면역세포화학적 방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 치주인대 세포와 치은 섬유모 세포의 교원질 합성량과 제 1교원질 발현에는 크지는 않지만 약간의 차이가 있었다. 세포 내에서의 교원질 양은 치주인대 세포가 조금 더 많은 수준이었으며, 세포에서 합성 분비해 낸 교원질을 알아내기 위해 측정된 배양 배지에서는 두 세포간에 거의 차이가 없었던 것으로 보아 두 세포는 교원질을 거의 동일한 수준 내지는 치주인대 세포가 조금 더 생성해 낸다는 것을 알 수 있어서 두 세포간에는 작지만 약간의 차이가 있었다. 또한 이 두세포가 가장 커다란 세포의 기질 생성 세포임을 알 수 있게 해 준다^{25~27)}. 다른 연구에서도 치주인대와 치은에서 분리해 낸 섬유모세포에서는 교원질과 fibronectin을 동시에 생산해 낸다고 하였으며^{19, 28~30)}, 이들이 생산해 내는 제 1교원질, 제 3교원질, fibronectin의 양은 생화학적 또는 면역조직화학적으로 검사한 결과 clone들마다 조금씩 틀리다고 하였다^{29, 31~33)}. Hou와 Yaeger에 의하면 몇몇의 연구에서 치주인대 세포가 치은 섬유모세포에 비해 제 1교원질과 fibronectin의 발현이 훨씬 더 많이 나타나고, 전체 단백질량이나 collagenase digestible protein량이 더 많이 측정되기도 하는 것은 치주인대 세포가 치은 섬유모세포 보다 더욱 더 활동적으로 생합성을 하는 증거라고 지적하기도 하였다¹⁹⁾.

면역조직화학적 연구에서 osteocalcin과 osteonectin, 제 1교원질을 사용한 결과는 다른 연구들과 조금 다른 결과를 나타냈다. 본 연구에서는 osteocalcin이 치은 섬유모세포에서는 발현되지 않는 상태에서 치주인대 세포에서만 발견되고, osteonectin과 제 1교원질의 발

현 양상은 치주인대 세포와 치은 섬유모 세포에서 서로 엇비슷하게 나타났으나, Wasi 등³⁴⁾과 Somerman 등¹⁶⁾은 치주인대 세포에서 osteonectin과 제 1교원질이 더 많이 나타난다고 하였다. 다른 연구들과 이렇게 차이가 나는 것은 골 관련 단백질들이 석회화 과정에서의 정확한 역할에 대해서 아직까지 정립되지 않았기 때문에 이론이 있는 것으로 여겨지며 이들이 골 항상성 조절에 있어서 만큼은 중요한 역할을 하는 것으로 보여지므로 여러 골 관련 단백질에 대해 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 치주치료의 최종 목적인 백악질과 치조골 간의 치주조직 재생을 일으킬 수 있는 치주인대 세포를 치은 섬유모세포와 비교 분석하기 위해 두 세포들을 건강한 사람의 조직에서 분리 배양하여 각각의 세포생물학적 특성을 알아보기 위하여 세포 형태, 알칼리성 인산 효소 활성도, 교원질 합성량, osteonectin과 osteocalcin, 제1교원질에 대한 면역세포화학적 검사 등을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 건강한 치주인대 세포는 치은 섬유모세포보다 알칼리성 인산 효소 활성도, 교원질 합성량 등에 있어서 조골 세포성 성격을 많이 가지고 있다.
2. 골 관련 단백질에 있어서는 osteocalcin은 치주인대 세포에서만 나타나고, osteonectin과 제 1교원질은 치주인대 세포와 치은 섬유모세포 모두에서 별 차이 없이 발현된 것으로 보아 immunocytochemistry에서 두 세포의 차이점을 특징지우기는 어려웠다.

본 연구 결과 치주인대 세포와 치은 섬유모 세포 간에는 조골 유사 세포의 특성을 바탕으로 한 두 세포간의 생물학적 차이점이 어

는 정도 있음을 알 수가 있었으며, 기능적으로 이중성의 세포군임을 추측할 수 있게 해주어 치주조직 재생에 있어서 두 세포의 서로 다른 역할이 있음을 알 수 있게 해 준다.

참고 문헌

1. Bowers GM, Schallorn RG, and Mellonig JT : Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. J Periodontol 53:509-516, 1982.
2. Polson AM and Caton J : Factors controlling periodontal repair and regeneration. J Periodontol 53:617-625, 1982.
3. Fernyhough W and Page RC : Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. J Periodontol 54:133-140, 1983.
4. Melcher, AH : On the repair potential of periodontal tissues. J. Periodontol. 47, 256-260, 1976.
5. Knox B and Aukhil I : Ultrastructural study of experimental cementum regeneration in rats. J Periodont Res 23:60-67, 1988.
6. Melcher AH and Cheong T : Fibroblast-like cell depress formation of bone-like tissues in vitro. J Dent Res 67:1419A, 1988.
7. Isidor F, Karring T, Nyman S, and Lindhe J : The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. J Clin Periodont 13:145-160, 1986.
8. Nyman S, Lindhe J, Karring T. and Rylander H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 9, 290-296, 1982.
9. N.Arceo, J.J.Sauk, J.Moehring, R.A.Foster, and M.J.Somerman : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. J Periodontol 62:499-503, 1991.
10. M.J.Somerman S.Y.Archer, G.R.Imm, and R.A.Foster : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. J Dent Res 67(1):66-70, 1988.
11. Karase T, Sato S, Yamada M, Hirayama A, Miake K, and Saito S : Human periodontal ligament cells in vitro : Characterization of alkaline phosphatase. J Bone Mineral Res 1(suppl 1):63A, 1986.
12. Yorimasa Ogata, Naomi Niisato, Takeshi Sakurai, Shunsuke Furuyama, and Hiroshi Sugiya : Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. J. Periodontol 66:1025-1031, 1995.
13. Piche JE, Carnes DL, Graves DT : Initial characterization of cells derived from human periodontia. J Dent Res 68:761-767, 1989.
14. Roberts WE : Cell population dynamics of periodontal ligament stimulated with parathyroid extract. Am J Anat 143:363-370, 1975.
15. Rao LG, Moe HK, Heersche HNM : In vitro culture of porcine periodontal ligament cells : Response of fibroblast-like and epithelial-like cells to prostaglandin E1, parathyroid hormone

- and calcitonin and separation of a pure population of fibroblast-like cells. *Arch Oral Biol* 23:957-964, 1978.
16. Somerman MJ, Young MA, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ : Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Arch Oral Biol* 35:241-247, 1990.
 17. B.Alliot-Licht, G.L.De Lange, and M.Gregoire : Effects of hydroxyapatite particles on periodontal ligament fibroblast-like cell behavior. *J Periodontol* 68:158-165, 1997.
 18. Hou LT and Yaeger JA : Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 64:1209-1218, 1993.
 19. Nijweide PJ, Vaniperen-van Gent AS, Kawilarang-de Haas EWM, Van Der Plas A, and Wassenaar AM : Bone formation and calcification by isolated osteoblast-like cells. *J Cell Biol* 93:318-323, 1982.
 20. Wergedal JE and Baylink DJ : Characterization of cells isolated and cultured from human bone. *Proc Soc Exp Biol Med* 176:60-69, 1984.
 21. Robey PG and Termine JD : Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 37:453-460, 1985.
 22. Manolagas SC, Burton DW, and Deftos LJ : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates the alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells. *J Biol Chem* 256:7115-7117, 1981.
 23. Beresford JN, Gallagher JA, and Russell RGG : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and human bone-derived cells in vitro : Effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinol* 119:1776-1785, 1986.
 24. Goseki M, Oida S, and Takeda K : Identification of bone-type alkaline-phosphatase mRNA from the human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 74:319-322, 1995.
 25. Vaheri A, Kurkinen M, Lehto VP, Linder E, Timpl R : Codistribution of pericellular matrix proteins in cultured fibroblasts and loss in transformation : fibronectin and procollagen. *Proc Natl Acad Sci* 75:4944, 1978.
 26. Gay S, Martin GR, Muller PK, Timpl R, Kuhn K : Simultaneous synthesis of type I and III collagen by fibroblasts in culture. *Proc Natl Acad Sci* 73:4037, 1976.
 27. Vaheri A, Alitalo K, Hedman K, Keski-Oja J, Kurkinen M, Wartiovaara J : Fibronectin and the pericellular matrix of normal and transformed adherent cell. *Ann NY Acad Sci* 312:343, 1978.
 28. Engel D, Schroder HE, Gay R, Clagett J : Fine structure of cultured human gingival fibroblasts and demonstration of simultaneous synthesis of types I and III collagen. *Arch Oral Biol* 25:283, 1980.
 29. Limeback H, Sodek J, Aubin JE : Variation in collagen expression by cloned periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 18:242, 1983.
 30. Connor NS, Aubin JE, Sodek J : Independent expression of type I collagen and fibronectin by normal fibroblast-like cells. *J Cell Sci* 63:233, 1983.
 31. Hurum S, Sodek J, Aubin JE : Synthesis of collagen, collagenase and

- collagenase inhibitors by cloned human gingival fibroblasts and the effect of concanavalin A. *Biochem Biophys Res Commun* 107:357, 1982.
32. Hassell TM, Stanek III EJ : Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. *Arch Oral Biol* 28:617, 1983.
 33. Hassell TM, Provenza DV, Foster RA : Synthetic activities of mass cultures and clones of human gingival fibroblasts. *Experientia* 42:66, 1986.
 34. Wasi S, Otsuka K, Yao KL, Tung PS, Aubin JE, Sodek J, Termine JD : An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can J Biochem Cell Biol* 62:470-478, 1984.

사진 부도 설명

- 그림 1 Morphology of periodontal ligament cells($\times 40$).
- 그림 2 Morphology of gingival fibroblasts($\times 40$).
- 그림 3 Immunocytochemistry of osteonectin in periodontal ligament cells($\times 200$).
- 그림 4 Immunocytochemistry of osteonectin in gingival fibroblasts($\times 200$).
- 그림 5 Immunocytochemistry of osteocalcin in gingival fibroblasts($\times 100$).
- 그림 6 Immunocytochemistry of osteocalcin in periodontal ligament cells($\times 100$).
- 그림 7 Immunocytochemistry of collagen type I in gingival fibroblasts($\times 200$).
- 그림 8 Immunocytochemistry of collagen type I in periodontal ligament cells($\times 200$).

사진 부도 (1)

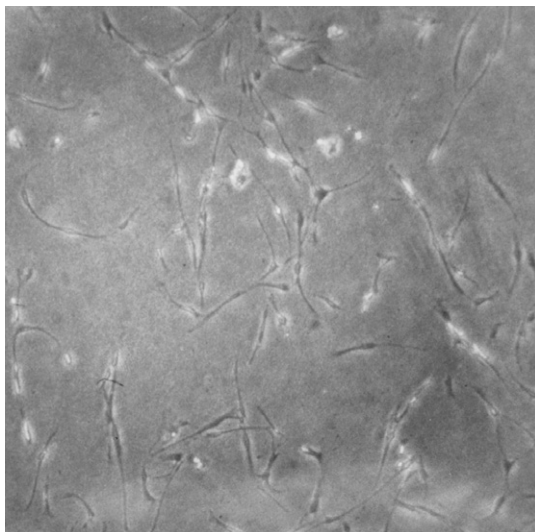


그림 1

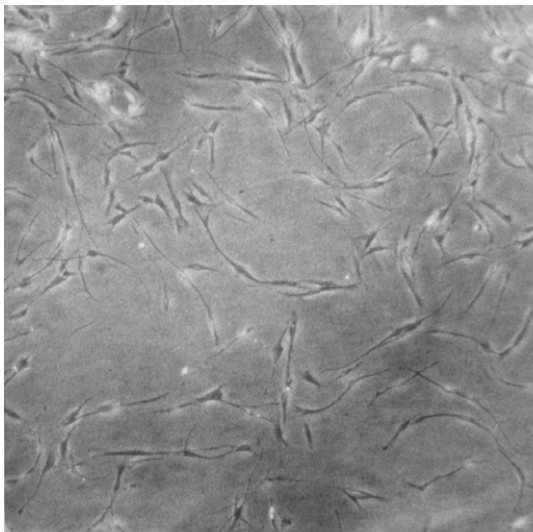


그림 2

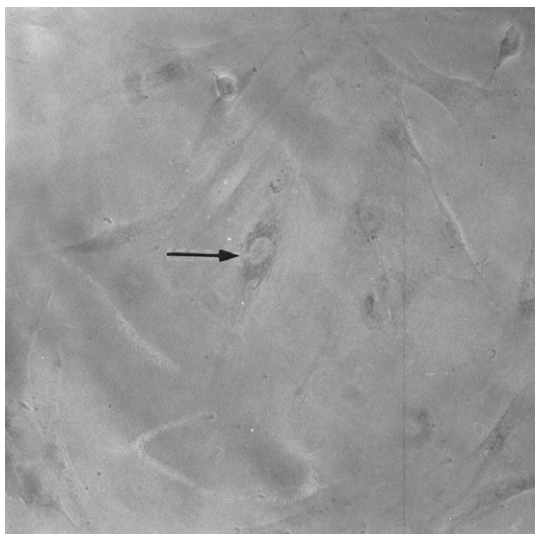


그림 3

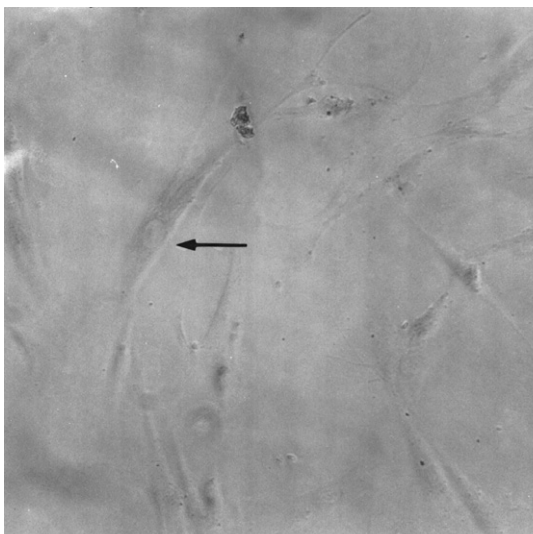


그림 4

사진 부도 (II)

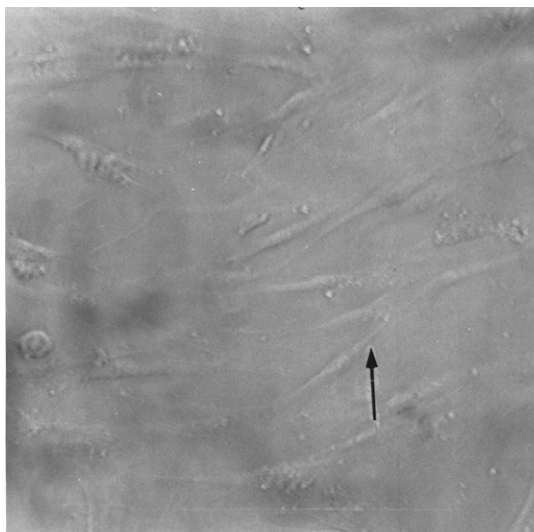


그림 5

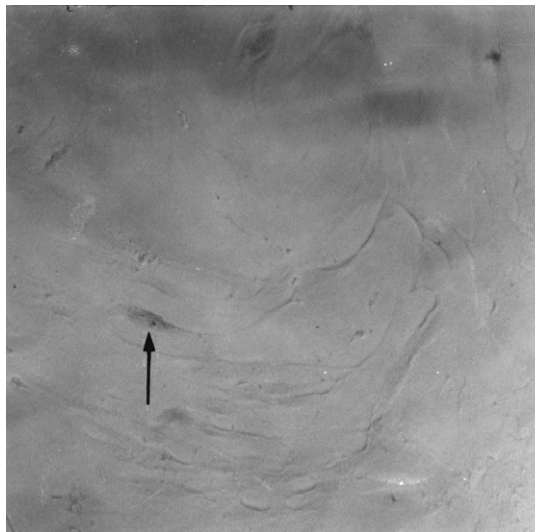


그림 6

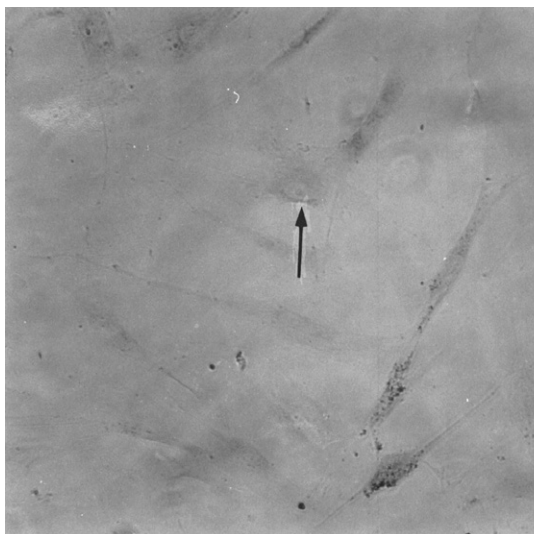


그림 7

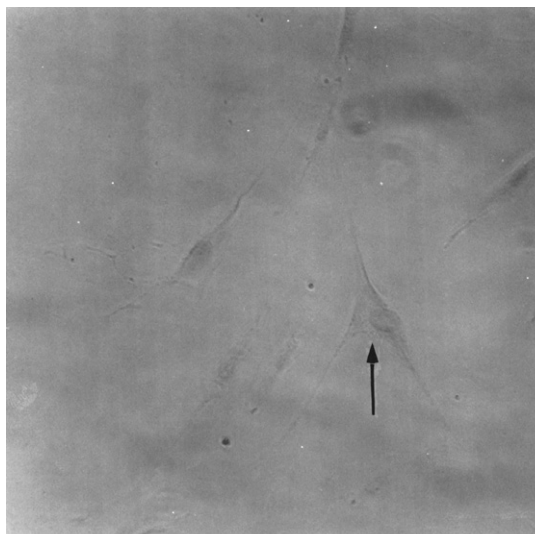


그림 8

Biological Characteristics of Human Periodontal Ligament Cells

Gwi-woon Park, Hyung-shik Shin, Hyung-keun You

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

Periodontal ligament cells may have a role in the regulation of hard and soft periodontal tissues, but their specific function has not yet to be determined. To evaluate further their role in periodontal regeneration, they were examined for osteoblast-like behavior. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts were primarily cultured from extracted premolar with non-periodontal diseases. Cells were cultured with DMEM at 37°C, 5% CO₂, 100% humidity incubator, and as a measure of cell characterization, it was examined that the morphology, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, and immunocytochemistry for osteonectin, osteocalcin, and collagen type I.

Healthy periodontal ligament cells has more osteoblastic-like cell property in alkaline phosphatase activity, and collagen synthesis than gingival fibroblast. Immunocytochemistry localization explained that calcitonin were expressed in periodontal ligament cells only, and osteonectin and type I collagen were produced in both cells simultaneously.

This results indicate that the growth characteristics of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts exhibit some differences in proliferative rates and biochemical synthesis. The differences may help to calrify the role such cells play in the regeneation of periodontal tissues.