

PDGF-BB와 TGF- β 1이 치은섬유아세포의 세포주기 조절 단백질의 발현에 미치는 영향

김응태 · 김명은 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환의 치료는 치은 염증 과정의 해소 뿐만 아니라 질환으로 상실된 치주조직을 재생시키는데 그 목적을 두고 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해서는 치주조직의 결합조직 세포들이 조직의 재생과 파괴 과정에 많은 역할을 해 주어야 하며, 특히 조직의 재생을 도모하기 위하여 성장인자 등을 투여했을 때 결합조직 세포들의 분열과 증식에 대해서는 많은 연구가 있었다. Transforming growth factor-beta(TGF- β)와 platelet-derived growth factor(PDGF)는 간엽세포의 증식을 조절하는 기능이 있는 것으로 알려진 성장인자 단백질이다¹⁻⁷. TGF- β 와 PDGF를 이용한 많은 생체의 연구에서 이들은 여러 가지 간엽 세포들의 유사 분열 증식과 결합조직의 기질 단백질 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{3,7-10}. 활성화된 PDGF단백질은 PDGF A-chain polypeptide와 PDGF B-chain polypeptide의 조합으로 구성되어 있어서 AA, BB, AB 등의 3가지 isoform을 만들어 낸다. 이들 isoform은 그들만의 독특한 PDGF 수용체 subunit를 가지고 있어서, PDGF 단백질 이량체들은 각각의 적절한 수용체 subunit와 결합하게 된다.

PDGF-AB와 PDGF-BB는 창상 부위에서 혈소판과

대식세포에서부터 유래되어 여러 간엽세포들의 유사분열과 증식을 촉진시키며¹¹, 또한 상처가 생기면 창상 부위의 섬유아세포와 상피세포들은 PDGF A-chain 유전자의 발현을 유도시키기도 한다²). 그리고 PDGF와 IGF-1을 혼합 투여하면 피부 창상의 치유를 촉진시키며¹³, 치주 창상 부위에서는 조직의 재생을 증진시키는 것으로 알려져 있다^{4,15}). TGF- β 는 창상 부위에서 혈소판과 대식세포에서 분비되며, 골성조직도 TGF- β 의 커다란 저장고 역할을 하기 때문에 치주 창상의 치유기전에 있어서 중요한 기능을 하는 것으로 여겨진다⁶). 창상 치유 과정 중 TGF- β 는 세포 증식에 있어서 다양한 기능을 나타내어 세포의 형태마다 또는 같은 세포에서는 실험실적 조건의 차이에 따라서 세포 증식을 촉진시키거나 혹은 억제시킨다⁷). 치주조직에서 TGF- β 와 PDGF를 각각 또는 혼합하여 사용한 후의 효과에 대해서는 지금까지 다양한 연구 결과가 있다. 초기의 생체의 연구에서 Piche 등(1989)¹⁸)은 치은섬유아세포에 대한 TGF- β 의 효과는 최소한의 증식 촉진이 있었다고 하였고, PDGF가 치은섬유아세포와 치주인대세포의 증식을 증가시킨다고 하였으며, 반면에 Piche와 Graves (1989)¹⁹)의 연구에서는 TGF- β 가 치은섬유아세포의 증식에 아무런 영향이 없다고 하였다. Oates

이 논문은 1998학년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 연구됨

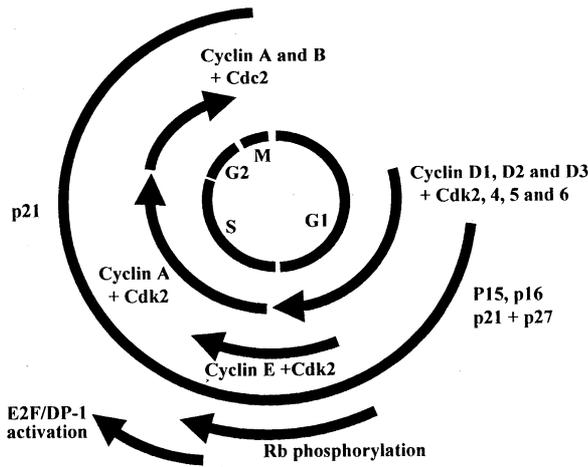


Fig 1. Cell cycle and cell cycle regulatory proteins

등(1993)²⁰⁾은 PDGF-AA와 PDGF-BB 모두는 치주인대세포의 DNA 합성을 증가시켰으며, 어느 특정 농도의 TGF- β 도 치주인대세포의 증식을 일으킬 수 있다고 하였다. 또한 이 연구에서 PDGF와 TGF- β 를 혼합하여 사용한 결과 TGF- β 는 PDGF의 유사 분열성 반응에 대한 조절자로 작용함을 알 수 있었다. 그리고 Dennison 등(1994)²¹⁾의 연구에서는 TGF- β 1 단독 또는 TGF- β 1과 PDGF를 혼합하여 사용하면 치은섬유아세포에서 보다 치주인대세포에서 더욱 더 많은 세포 증식이 있었던 반면에, PDGF를 단독으로 사용하면 치주인대세포 보다 치은섬유아세포의 증식을 더 많이 일으킨다고 하여 치주조직 창상 치유 과정 중에 이 두 성장인자 모두 새로운 결합조직의 형성을 촉진할 수 있을 것이라고 하였다.

한편 정상 조직의 발생과 분화를 이해하기 위해서는 정상 세포주기의 특성과 조절에 대한 연구가 필요하다. 세포주기는 DNA 합성이 이루어지는 S기, 유사분열을 하는 M기, 그리고 S기와 M기로 들어가기 직전에 준비 단계인 G1기와 G2기 등의 4기로 구분된다(Fig. 1). 조직이 정상적으로 성장을 하거나 또는 질환에 이환된 경우에도 세포 증식과 세포사 간에는 항상 균형이 유지되고, 대부분의 생식 세포들은 동일한 자세포를 만들어 내기 위한 세포 분열을 하게 되며, 이 때 세포 분열을 유도하는 과정이 반드시 필요하고 모세포에 존재하는 유전적인 정보가 복사되어

야 한다. 세포주기를 조절하는 단백질은 크게 cyclin과 cyclin-dependent kinases(cdk) 등으로 분류된다^{22, 23)}. cdk는 serine/threonine protein kinase이며, cyclins 중 어느 한 가지와 결합했을 때에만 기능을 하고, 각각의 cyclin들은 다양한 cdk와 결합할 수 있다. Cyclin의 기능은 기본적으로 threonine residue의 인산화 반응에 의해 cdk가 활성화 되는 동안 cyclin 수준의 변화에 의해서 조절된다. Cyclin은 cdk의 활성을 조절하며 세포주기와 관련있는 효소들을 제어할 수 있는 능력이 있다²⁴⁾. 그러므로 cyclin-cdk 복합체의 조합과 활성화 등은 세포주기를 조절하는 데 있어서 아주 중요한 의미를 갖는다.

Cyclin은 두 부류로 분류할 수 있는데, 그 하나는 G1 cyclin으로써 이는 세포주기의 G1기에 cdk와 결합하며 S기로 진입하는 데 반드시 필요로 한다. 또 다른 하나는 핵분열성 cyclin으로써 M기에 진입하기 위하여 G2기 동안 cdk와 결합하는 것이다²⁵⁾. G1 cyclin 복합체는 cyclin, cdk, cdk 억제제인 p21, proliferating cell nuclear antigen(PCNA) 등의 4개 구조로 존재한다²⁶⁻³³⁾. 세포주기의 G1기에서 S기로 진입하기 위한 과정 중 초기 G1기에서는 cyclin D 복합체가 필요하며, 후기 G1기에서는 cyclin E 복합체의 활성이 필요하다³⁴⁻³⁷⁾. D-형 cyclin(D1, D2, D3)은 cdk 4 뿐만 아니라 cdk 6와 결합을 하며, cyclin E는 cdk 2와 결합을 한다. 이 cyclin들은 G1기에서 S기로 전환되는 시점에서 서로 다른 별개의 역할을 하고 있으며, cdk와 cyclin 모두는 일단 한번 결합이 되면 cyclin-activating kinase에 의해서 활성화된다³⁸⁻⁴⁰⁾.

Cyclin dependent kinase inhibitor는 cdk에 결합하여 cdk의 활성을 억제하는 단백질들이며 이 중 하나인 p21은 G1 cyclin-cdk 복합체에 결합하여 이들을 억제하는 기능을 나타낸다⁴¹⁾. p21은 G1 cyclin 복합체의 일정한 부분을 차지하고 있지만, 복합체내에서 화학량적 비율이 증가하는 경우에만 cdk 억제제로서 작용을 하게 된다⁴²⁻⁴⁴⁾. p21은 kinase 억제제로서의 활성이 있을 뿐만 아니라, 세포주기의 S기에서 PCNA와 반응을 하여 이 PCNA가 DNA polymerase의 활성을 차단함으로써 DNA 복제가 일어나지 못하도록 한다^{45, 46)}.

본 연구의 목적은 치주조직의 창상 치유 과정에 많은 영향을 주는 PDGF-BB와 TGF- β 1 을 단독 또는 혼합으로 사용하여 이들이 치은섬유아세포의 증식에 있어서 세포주기 조절 단백질들에 미치는 영향을 알아보기 위함이다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

본 연구에서 사용된 치은섬유아세포는 임상적으로 염증이 없는 상태의 치은을 절제하여 얻었다. 치관길이 확장을 위한 치은절제술 후 치은 조직을 세절하여 60mm 조직 배양용 접시에 5-6개 정도 위치시켰다. 약 30분 간 37°C, 5% CO₂, 습도 100%의 배양기에서 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)과 1% 항생제 (10,000units/ml Penicillin G, 10,000 μ g/ml Streptomycin, 25 μ g/ml Amphotericin B 포함, Gibco, USA)가 들어 있는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, USA)을 3ml씩 첨가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 2-3일 간격으로 배양액을 교환하였다.

단일 세포층이 밀생에 도달했을 때 배양액을 제거하고 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 PBS로 2회 세척하였다. 부착이 안 된 세포와 PBS를 제거하고 0.25% Trypsin/EDTA(10 \times , Gibco, USA)를 2ml씩 넣고 3분 간 clean bench에서 방치하여 부착 세포를 분리시킨 후 15ml 원심 분리용 시험관으로 옮겨 1,200 rpm으로 10분 간 원침하였다. 원침 후 상층액을 버리고 PBS를 가하여 Vortex mixer로 혼합하여 세척한 후 다시 1,200rpm으로 10분간 원침하였다. 다시 상층액을 버리고 DMEM을 첨가하여 Vortex mixer로 혼합하여 세포 부유액을 만들고 이를 60mm 배양 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였고, 계대 배양은 1:3-4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 5, 6회 계대 배양된 치은섬유아세포를 사용하였다.

2. 세포 수 측정

배양 접시에서 완전 밀생에 도달한 단층의 세포들을 trypsin으로 분리해 내었다. 이 세포들을 배지 배양액으로 현탁시키고 6 well dish에 2 \times 10⁵ 개의 세포수가 되도록 분주하였다. TGF- β 1(Sigma, USA) 10ng/ml, PDGF-BB(Sigma, USA) 20ng/ml을 각각 또는 혼합하여 투여하고 3일 동안 배양한 후 trypan blue exclusion 검사 방법으로 살아있는 세포의 수를 계산하였다. 한편 세포의 밀생 정도를 알아보기 위하여 2 \times 10⁵ 개의 세포를 6 well dish에 분주하고 3일 후에 광학현미경(\times 40)으로 촬영 비교하였다.

3. MTT assay

5, 6회 계대 배양된 치은섬유아세포를 0.25% Trypsin/EDTA로 떼어내어 trypan blue로 염색한 후 혈구계수기로 세포 수를 세어 24well plate의 각 well 당 1 \times 10⁴개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일 간 37°C, 5% CO₂, 100% 습도의 배양기에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 제거하고 새로운 DMEM 1 ml을 각각의 well에 첨가하였다. 그리고 TGF- β 1 10ng/ml, PDGF-BB 20ng/ml을 각각 또는 혼합하여 첨가하고 1일 및 3일 동안 배양하였으며 대조군에는 증류수를 넣었다. 각각의 시간이 경과된 후 생리 식염수로 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma, USA) 용액 200 μ l씩을 각각의 well에 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200 μ l의 DMSO(Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96 well plate 상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)에 plate를 넣고 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 실험은 4회 반복 시행하였다.

4. Western blot analysis

배양 접시에서 세포의 완전 밀생 성장이 되도록 배

Table 1. Cell number count and MTT assay in gingival fibroblasts supplemented with PDGF-BB and TGF-β1

	Cell number(×10 ⁴)	MTT(absorbance)
Control	5.29±0.82	2.89±0.08
PDGF-BB	11.60±0.63*	3.65±0.05*
TGF-β1	7.42±0.59*	3.06±0.07*
PDGF-BB+TGF-β1	6.33±0.66*	2.89±0.03

* Significantly different from control(p<0.05)

양한 후 trypsin으로 세포를 떼어내어 100mm 배양 접시에 1×10⁵ 개의 세포수가 되도록 하였다. 여기에 위에서 설명한 방법대로 농도별로 TGF-β1과 PDGF-BB를 첨가한 후 3일 동안 배양하였다. 3일 후 Tri-reagent 용액(Molecular Research Center, Inc., USA)을 이용하여 세포 단백질을 추출하고, Lowry 방법⁴⁷⁾으로 단백질 농도를 측정하였다. 각 실험군 별로 추출된 단백질 50 μg 씩을 사용하여 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 후 nitrocellulose membrane(Bio- Rad, USA)에 transfer 하였다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 membrane을 blocking 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 다음과 같은 1차 항체들을 이용하여 90분 동안 반응시켰다. 1) a mouse anti-human monoclonal antibody for p21(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 2) a rabbit anti-human polyclonal antibody for cdk 2(Santa Cruz Biotechnology), 3) a rabbit anti-human polyclonal antibody for cdk 4(Santa Cruz Biotechnology), 4) a rabbit anti-human polyclonal antibody for cdk 6(Santa Cruz Biotechnology), 5) a mouse anti-human monoclonal antibody for cyclin D1(Santa Cruz Biotechnology), 6) a mouse anti-human monoclonal antibody for cyclin E(Oncogene Science, Uniondale, NY, USA). 1차 항체로 반응시킨 후 PBS로 2회 세척해 내고, anti-mouse or anti-rabbit IgG-horse raddish peroxidase conjugated secondary antibody(Santa Cruz Biotechnology)로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하였다. 그 후에 membrane을 ECL

western blotting detection reagent(Amersham, UK)로 반응시키고 Hyperfilm-MP(Amersham)에 노출시켰다. 사용된 단백질이 동일한 양인지를 확인하기 위하여 membrane을 1× Ponceau S 용액(Sigma, USA)에 염색한 후 발현 정도를 서로 비교하였다.

5. 통계분석

측정한 세포 수와 백분율로 환산된 MTT 분석의 평균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 처리하였다.

III. 결과

1. 세포 증식율

치은섬유아세포에 PDGF-BB와 TGF-β1을 첨가하고 세포수를 측정한 결과는 Table 1 및 Fig 2와 같다. 성장 인자를 투여하고 3일 후에 세포수를 측정한 결과 가장 증가한 것은 PDGF-BB를 투여한 치은섬유아세포였으며, 그 다음으로 TGF-β1을 단독으로 투여한 경우, PDGF-BB와 TGF-β1을 혼합 투여한 경우의 순으로 세포 성장이 일어났다. 세포 증식 정도를 MTT 분석 방법을 이용하여 측정한 결과는 table 1 및 Fig 3과 같다. MTT 분석에서도 세포수와 마찬가지로 PDGF-BB를 투여한 경우가 가장 많은 세포 증식이 일어났으며, TGF-β1과 PDGF-BB 및 TGF-β1을 혼합 투여한 경우는 이 보다 약한 증식을 일으켰다. 한편, 성장 인자 투여 후의 세포 증식 정도를 광

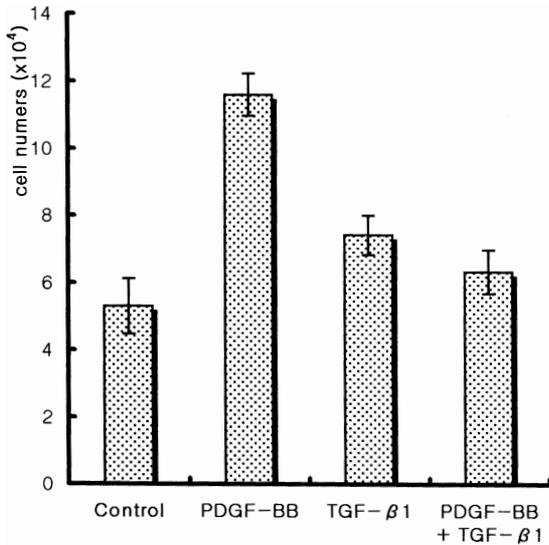


Fig 2. Effects of PDGF-BB and TGF-β1 on gingival fibroblasts growth. Cell numbers were counted by trypan blue exclusion test after 3 days incubation(Mean±S.D.).

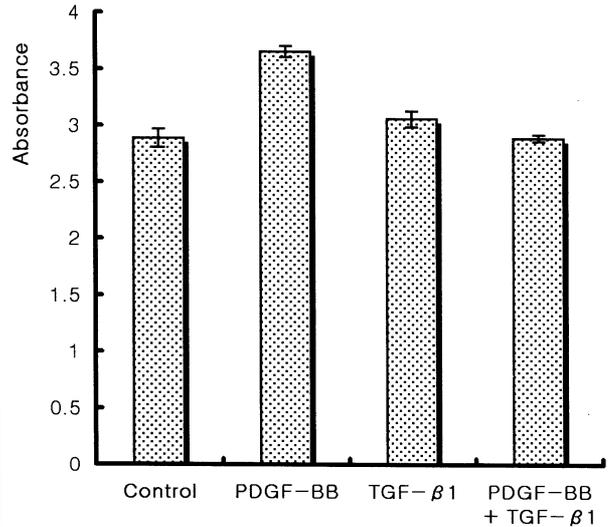


Fig 3. Effects of PDGF-BB and TGF-β1 on gingival fibroblasts growth. MTT assay was performed after 3 days incubation

학 현미경으로 관찰한 결과도 PDGF-BB를 투여한 경우가 가장 높은 밀생 정도를 보였으며, TGF-β1을 단독으로 투여한 경우와 PDGF-BB와 TGF-β1을 혼합으로 투여한 경우의 세포 밀생 정도는 거의 비슷하였다(Photo. 1-4).

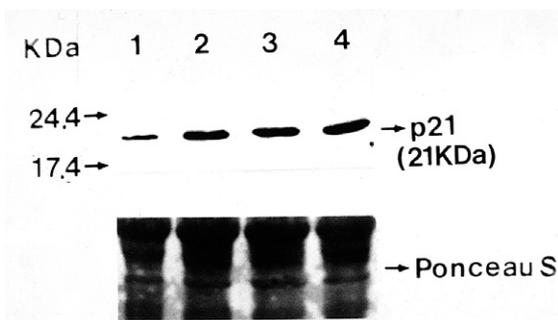


Fig 4. Western blot analysis for p21 in human gingival fibroblasts exposed to PDGF-BB and TGF-β1 for 3 days. Equal cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel(KDa: kilodalton, 1: control, 2: PDGF-BB, 3: TGF-β1, 4: PDGF-BB+TGF-β1).

2. p21의 발현

p21은 cyclin-cdk 복합체에 결합하여 이들의 활동을 억제하는 단백질이며 세포주기의 진행과 억제에 관련이 있다. PDGF-BB와 TGF-β1을 투여하고 3일 후에 p21의 발현은 3군 모두에서 서로 비슷한 정도로 대조군에 비해 증가하였다(Fig 4). p21은 세포주기에 있어서 일반적으로 광범위하게 cyclin-cdk 복합체에 결합하여 주기의 진행을 억제하는 단백질로 알려져 있으나, 본 연구의 결과와 같이 PDGF-BB와 TGF-β1 등의 성장인자를 사용한 경우에는 p21의 영향이 별 차이가 없는 것으로 여겨진다.

3. cdk의 발현

세포주기 G1기의 초기 부분에서는 cyclin D1과 cdk 4 또는 6이 결합하여 관여를 하며, G1기의 후기에서는 cyclin E와 cdk 2가 관여를 하므로 성장인자들이 이 시기의 세포주기 조절 단백질들에 미치는 영향을 알아보려고 western blot 분석을 하였다. cdk

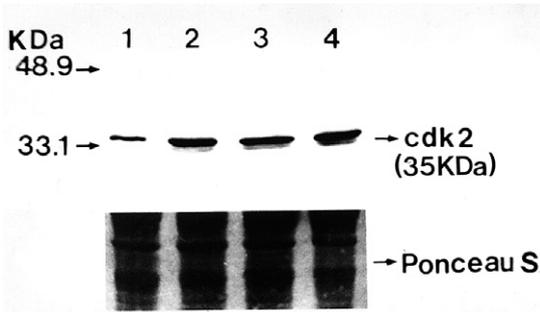


Fig 5. Western blot analysis for cdk 2 in human gingival fibroblasts exposed to PDGF-BB and TGF- β 1 for 3 days. Equal cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel(KDa : kilodalton, 1 : control, 2 : PDGF-BB, 3 : TGF- β 1, 4 : PDGF-BB+TGF- β 1).

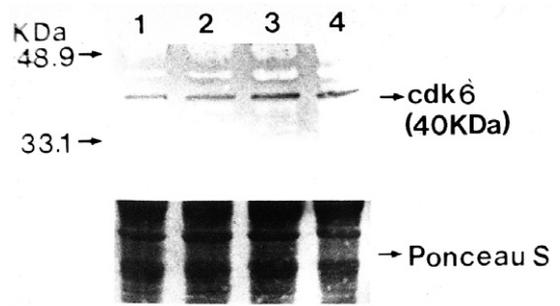


Fig 7. Western blot analysis for cdk 6 in human gingival fibroblasts exposed to PDGF-BB and TGF- β 1 for 3 days. Equal cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel(KDa : kilodalton, 1 : control, 2 : PDGF-BB, 3 : TGF- β 1, 4 : PDGF-BB+TGF- β 1)

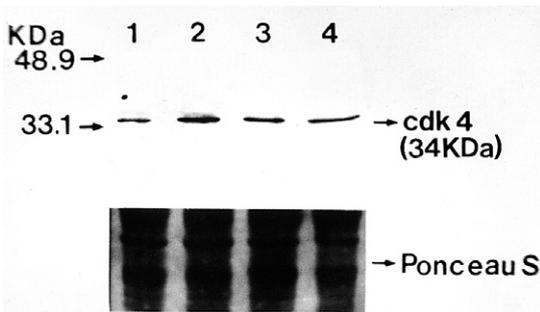


Fig 6. Western blot analysis for cdk 4 in human gingival fibroblasts exposed to PDGF-BB and TGF- β 1 for 3 days. Equal cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel(KDa : kilodalton, 1 : control, 2 : PDGF-BB, 3 : TGF- β 1, 4 : PDGF-BB+TGF- β 1)

2의 발현은 세포 증식율과 마찬가지로 PDGF-BB를 투여한 경우에 가장 많이 증가하여 이 조절 단백질의 역할을 추측할 수 있었다(Fig 5). PDGF-BB 다음으로는 TGF- β 1을 투여한 경우가 PDGF-BB와 TGF- β 1을 혼합하여 투여한 경우보다 약간 증가한 듯한 양상을 보였다. 조절 단백질 cdk 4의 경우에도 PDGF-BB의 발현 양상이 가장 강하게 나타났으며 그 다음으로 TGF- β 1을 투여한 경우와 PDGF-BB와 TGF- β 1을 혼합 투여한 경우가 비슷한 양상으로 단백질이 발현되었다(Fig 6). 이러한 결과는 역시 세포수의 결

과와 일치하고 있다. cdk 6는 앞의 두 조절 단백질들과는 약간 다른 양상으로 나타났다. TGF- β 1을 투여한 경우의 단백질 발현이 다른 성장인자를 투여한 경우보다 약간 증가하였으며, PDGF-BB를 투여한 경우 및 PDGF-BB와 TGF- β 1을 혼합 투여한 경우의 단백질 발현 양상은 비슷한 정도로 나타났다(Fig 7).

4. cyclin의 발현

cyclin D1은 PDGF-BB와 TGF- β 1을 투여한 경우

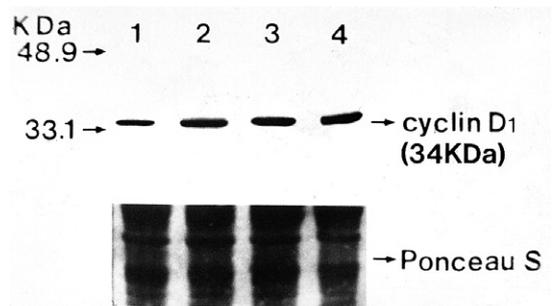


Fig 8. Western blot analysis for cyclin D1 in human gingival fibroblasts exposed to PDGF-BB and TGF- β 1 for 3 days. Equal cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel(KDa : kilodalton, 1 : control, 2 : PDGF-BB, 3 : TGF- β 1, 4 : PDGF-BB+TGF- β 1)

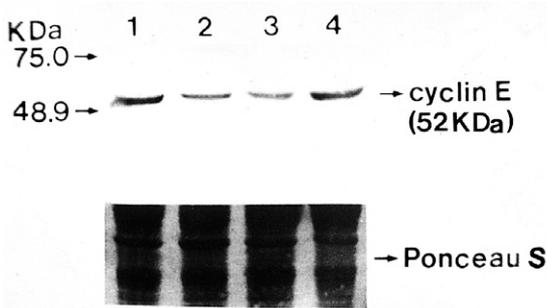


Fig 9. Western blot analysis for cyclin E in human gingival fibroblasts exposed to PDGF-BB and TGF- β 1 for 3 days. Equal cellular proteins were loaded and transferred to a membrane as showed at the lower panel(KDa : kilodalton, 1 : control, 2 : PDGF-BB, 3 : TGF- β 1, 4 : PDGF-BB+TGF- β 1)

의 단백질 발현이 비슷한 정도로 나타났으며, PDGF-BB와 TGF- β 1을 혼합 투여한 경우에는 각각의 성장 인자를 단독 투여한 경우보다 발현이 약간 약한 듯한 양상을 보였다(Fig 8). 조절 단백질 cyclin E의 경우는 PDGF-BB와 TGF- β 1의 성장 인자를 투여한 모든 경우의 단백질 발현 양상이 대조군과 비해 서로 비슷한 정도로 나타났다(Fig 9).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서 PDGF-BB와 TGF- β 1을 치은섬유아세포에 투여한 결과 3일 후에 세포주기 조절 단백질들인 cdk 2, 4, 6, cyclin D1 등의 단백질 발현이 증가하였다. 그리고 세포 증식은 PDGF-BB를 투여한 경우에 증식이 가장 많이 일어났으며, 그 다음으로 TGF- β 1을 투여한 경우, PDGF-BB와 TGF- β 1을 혼합 투여한 경우의 순으로 증가하였다. 즉, 세포주기 조절인자들이 성장 인자의 자극에 의해 촉진되어 더 많은 발현을 하여 결국은 세포수의 증식을 가져온 것으로 여겨진다. 이 과정에서 세포주기의 광범위한 억제제로 작용하는 것으로 알려진 p21은 세포주기의 진행에 별다른 영향을 미치지 못하였다.

치주질환 뿐만 아니라 치주치료 그 자체도 치주조직을 파괴하고 조직에 손상을 일으키게 된다. 그러나 조직의 손상이 질환에 의한 것이든 또는 치료에

의한 것이든 그 수복 과정은 거의 유사하여, 조직 손상을 받은 부위로 세포들이 이동하고 세포 증식이 일어난 후에 새로운 조직 성분들이 합성되게 된다. 이러한 과정 중에 많은 성장인자나 cytokine 등의 물질들에 의해 세포 이동이 영향을 받게 되는 데 그 중의 하나가 PDGF와 TGF- β 인 것이다. 치유 과정을 조절하는 이들 성장인자들의 기능과 그 사용에 대한 최근의 연구들은 치주조직의 창상 치유에 치료제로 사용할 수 있음을 알게 해 준다. 치주조직 창상 부위의 치유 과정은 비록 다른 부위의 치유 과정과 전체적으로는 비슷하지만 소실된 치주조직의 재생과 함께 신부착이 일어나도록 하기 위해서는 약간의 변형이 필요하다. 즉, 구강상피는 치근단 이동이 안 되도록 억제되어야 하며, 치주인대와 치조골 세포들은 소실되었던 조직의 재생이 일어날 수 있도록 특수한 조건이 주어져야 한다. 치은 결합조직으로부터의 섬유아세포는 치주인대세포와 함께 재생 과정에 있어서 중요한 역할을 하는 세포이며, PDGF와 TGF- β 가 이들 세포에 미치는 영향에 대해서 많이 연구되어져 왔다. PDGF와 TGF- β 에 반응시킨 치주인대세포와 치은섬유아세포는 세포 증식에 있어서 많은 차이점을 나타낸다. TGF- β 를 투여한 경우는 치은섬유아세포에서 보다 치주인대세포에서의 증식이 더 많이 일어났으며, PDGF와 TGF- β 를 혼합 투여하였을 때에도 치주인대세포에서 증식이 더 일어난 반면, PDGF를 첨가한 배양에서는 치은섬유아세포의 증식이 더욱 촉진되었다고 하였다²¹⁾. 치은섬유아세포를 이용한 본 연구에서도 PDGF-BB에 대해서는 세포 증식도 많이 일어나고 세포주기 조절 인자들의 단백질 발현도 다른 성장인자에 비해 약간씩 증가하였다. 물론 치은섬유아세포 외에는 다른 세포를 사용하지 않아서 성장 인자들의 효과를 직접적으로 비교하기는 어렵지만, 성장인자에 반응한 세포 증식의 결과로 유추해 볼 때에 치은섬유아세포에서는 TGF- β 보다 PDGF에 대해 더 민감하게 반응할 것으로 생각된다. Oates 등(1993)²⁰⁾의 연구에서도 치주인대세포에 대한 PDGF와 TGF- β 의 효과를 측정한 결과 TGF- β 이 유사분열의 활성성을 더욱 증가시킨다고 하였으며, 또한 두 성장인자를 같이 사용하는 경우에는

TGF- β 1 이 PDGF에 대한 반응을 증가시킨다고 하였다. Piche와 Graves(1989)¹⁹⁾도 PDGF와 TGF- β 가 치은섬유아세포의 세포 수를 더 많이 증가시켰다고 하였으며, Wrana 등(1986)⁴⁸⁾의 연구에서도 완전 밀생이 안 된 치은섬유아세포에 TGF- β 를 투여했을 때 세포 성장에 있어서 이 성장 인자는 매우 약한 성장 촉진 효과만을 나타낸다고 하였다. 한편 PDGF와 TGF- β 1을 치은섬유아세포에 투여하여 crystal violet 염색으로 세포 증식을 측정할 결과는 두 성장인자를 동시에 투여한 경우, PDGF, TGF- β 1의 순으로 성장을 촉진시키는 것으로 나타나 PDGF가 TGF- β 1보다 치은섬유아세포에서의 세포 증식이 더 효과가 있는 것으로 밝혀졌다⁴⁹⁾.

한편 사용되는 성장 인자의 농도도 연구마다 또는 실험 조건마다 조금씩 차이가 있다. Oates 등(1993)²⁰⁾의 연구에서 TGF- β 1이 치주인대 세포에 대해 매우 의미있는 유사분열 효과를 나타냈지만 농도 변화(1.0ng/ml 또는 10.0ng/ml)에 있어서는 별 다른 차이가 없었다고 하였다. 또한 이 연구에서 PDGF에 대한 치주인대세포의 유사분열 반응은 실험된 최고 농도인 50ng/ml까지 용량-의존적 양상으로 계속 증가하였다. Pfeilschifter 등(1990)⁵⁰⁾은 골기질의 침착 정도와 관련된 연구에서, 쥐의 두개골을 이용하여 실험실적으로 TGF- β 1의 효과를 측정할 결과 0.1nM에서 10nM(250ng/ml)까지 용량-의존적으로 증가하는 양상을 보였으며, 또한 PDGF도 1nM에서 10nM(320ng/ml)까지의 농도에서 계속 증가하였다. 한편 Dennison 등(1994)²¹⁾의 연구에서도 10ng/ml의 TGF- β 1과 20ng/ml의 PDGF를 사용하여 치주인대세포와 치은섬유아세포의 세포 증식을 측정할 결과, 3일 후에 PDGF는 치은섬유아세포의 증식을 증가시켰으며, TGF- β 1의 단독 투여 및 TGF- β 1과 PDGF의 혼합 투여는 치주인대세포의 증식을 가져온다고 하였다. 위와 같은 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 10ng/ml TGF- β 1과 20ng/ml PDGF-BB를 사용하였다.

세포주기 단백질인 cyclin D와 cdk 4, 6는 세포주기의 G1기 초기 또는 중기에 결합을 하여 세포주기의 진행에 영향을 미치며, cyclin E와 cdk 2는 G1기

의 말기에 결합을 하여 세포주기에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 PDGF-BB를 투여했을 때에 세포 증식이 가장 잘 일어났으며, 이때 가장 단백질 발현이 증가한 세포주기 조절인자는 cdk 들인 것으로 밝혀져서 아마도 이 조절 인자들이 PDGF-BB에 의한 세포 증식 촉진에 가장 많이 관여를 한 것으로 생각된다. PDGF-BB 투여에 대한 cyclin D와 cyclin E의 단백질 발현은 다른 성장 인자를 투여한 경우와 거의 유사한 정도로 나타났는데, 이는 이들 성장 인자들에 대해 cyclin이 그다지 강한 반응을 나타내지 않는 다던가 또는 cyclin의 기능이 나 작용이 cdk나 그 외의 어떤 다른 세포주기 조절인자들에 의해 방해될 받았을 것으로 추측된다. 한편 세포 증식을 일으켰던 PDGF-BB를 TGF- β 1과 혼합하여 사용했을 때에는 단독으로 투여한 경우보다 오히려 약한 세포 증식을 일으키고 세포주기 조절인자들에 많은 영향을 미치지 못하였다. 이는 PDGF-BB에 대한 증식 반응을 TGF- β 가 조절하기 때문인 것으로 여겨진다^{51, 52)}.

cdk 억제제인 p21은 이전의 연구에서 cyclin-cdk의 활성을 억제하여 G1-S기로의 진행을 조절하는 것으로 알려져 있다^{53, 54)}. 즉, cyclin-cdk 복합체에 결합을 하여 kinase 활성을 억제하는 기능을 가진 것이다. 그러나 p21이 항상 cyclin-cdk의 억제제로 작용하지 않는다는 것이 Zhang 등(1994)³³⁾과 Chen 등(1995)⁵⁵⁾의 연구에서 밝혀졌다. 이 연구들은 증식 중인 세포에서는 p21의 대부분 단백질이 활성화된 cyclin-cdk 복합체에서 발견되었다고 하였다. 그리고 Hiyama 등(1997)⁵⁶⁾의 연구에서도 p21의 발현을 증가시켰음에도 불구하고 cdk kinase와 관련된 cyclin D1은 계속해서 활성화된 상태로 남아있었으며, 세포 성장도 계속해서 일어났다고 하였다. 본 연구에서도 PDGF-BB와 TGF- β 1에 대한 p21의 western blot 결과, p21의 발현은 거의 차이가 없었으며 오히려 대부분의 cyclin-cdk 복합체의 발현이 증가하는 양상을 보였다. 이와 같은 사실은 p21과 cyclin-cdk 복합체가 결합하고 있을 때의 절대적인 비율이 p21의 세포주기 억제 양상을 결정한다는 것으로 설명할 수 있다⁵⁵⁾. 즉 cyclin의 증가로 유도되어 p21의 수준도 증

가한다든가 또는 cyclin의 비율이 p21보다 높은 상태이면 cyclin-cdk-p21 복합체는 항상 안정되고 활성화된 상태를 유지하여 세포주기가 계속 진행이 되는데, 반대로 p21의 수준이 cyclin-cdk 복합체의 수준을 능가하게 되면 세포주기는 더 이상 진행하지 못하여 세포 증식이 일어나지 않는다는 것이다. 이와 같은 설명으로 cyclin과 cdk의 증가된 단백질 발현과 동시에 p21의 단백질 발현이 나타나는 결과를 설명할 수 있겠다.

본 연구 결과 PDGF-BB와 TGF- β 1를 치은섬유아 세포에 투여하면 p21의 단백질 발현이 세포주기 진행에 별 다른 영향 없이 cdk 등의 단백질 발현 증가로 세포 증식이 일어남을 알 수 있었으며, 특히 PDGF-BB의 투여가 세포주기 단백질의 발현 증가 및 세포 증식을 더 많이 일으킴을 알 수 있었다. 본 연구에 이어 앞으로는 더 많은 세포주기 조절 단백질들과 성장 인자들간의 관련성에 대한 연구와 이 조절 단백질들에 대한 kinase 활성 분석에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구는 치주조직의 창상 치유 과정에 많은 영향을 미치는 PDGF-BB와 TGF- β 1을 사용하여 이들이 세포주기 조절 단백질들에 미치는 영향을 알아보기 위하여 치은섬유아세포를 분리 배양한 후 세포 증식 측정과 세포주기 조절 단백질들에 대한 western blot 분석을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포 증식을 측정한 결과 PDGF-BB가 가장 높은 증식율을 나타냈으며, 그 다음으로 TGF- β 1을 투여한 경우, PDGF-BB와 TGF- β 1을 혼합 투여한 경우 등의 순으로 증식이 일어났다.
2. cdk 억제제인 p21의 단백질 발현은 대조군에 비해 약간 증가는 하였지만 성장 인자를 투여한 실험군 간에 별 다른 차이는 없었다.
3. PDGF-BB를 투여한 경우 cdk 2, 4의 단백질이 가장 많이 발현되었고 TGF- β 1을 투여하거나 PDGF-BB와 TGF- β 1을 혼합 투여한 경우는 발현 정도가 거의 비슷하였다.

4. PDGF-BB와 TGF- β 1을 각각 투여한 경우 cyclin D1의 단백질 발현은 대조군 보다 약간 증가하였지만 서로 간에 큰 차이는 없었으며, cyclin E의 발현은 대조군에 비해 별 다른 차이가 없었다.

VI. 참고문헌

1. Ross, R., Vogel, A. The platelet-derived growth factor. *Cell* 14:203-210, 1978
2. Shipley, G.D., Pittelkow, M.R., Wille, Jr, J.J., Scott, R.E., Moses, H.L. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res* 46:2068-2071, 1986
3. Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Morishima, C., Deuel, T.F. Growth factor induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. *J Clin Invest* 87:694-703, 1991
4. 권영희, 박준봉. 혈소판유래성장인자-BB가 골간질세포와 치주인대세포의 성장에 미치는 연구. *대한치주과학회지* 26(4):949-966, 1996
5. 김태일, 구영, 류인철, 정종평, 한수부, 최상묵, 손성희. 자동 영상분석 계기를 이용한 골 유도 재생능력의 분석에 관한 조직계측학적 연구. *대한치주과학회지* 26(3):771-777, 1996
6. Hebda, P.A. Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explants cultures. *J Invest Derm* 91:440-445, 1988
7. Wahl, S.M., Wong, H., McCartney-Francis, N. Role of growth factors in inflammation and repair. *J Cellular Biochem* 40:193-199, 1989
8. Cochran, D.L., Rouse, C.A., Lynch, S., Graves, D.T. Platelet derived growth factor effects on calcium release from mouse calvaria. *J Dent*

- Res 70:352, 1991
9. Roberts, A.B., Sporn, M.B. Transforming growth factor beta. *Adv Cancer Res* 51:107-145, 1988
 10. Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K. Transforming growth factor beta: Rapid function of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci(USA)* 83:4167-4171, 1986
 11. Ross, R. Platelet-derived growth factor. *Ann Rev Med* 38:71-79, 1987
 12. Antoniades, H.N., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., Kiritsy, C.P., Lynch, S.E. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor(PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci(USA)* 88:565-569, 1991
 13. Lynch, S.E., Colvin, R.B., Antoniades, H.N. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 84:640-646, 1989
 14. Lynch, S.E., Williams, R.C., Polson, A.M. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 16:545-548, 1989
 15. Lynch, S.E., deCastilla, G.R., Williams, R.C. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 62:458-467, 1991
 16. Graves, D.T., Cochran, D.L. Mesenchymal cell growth factors. *Crit Rev Oral Biol Med* 1(1):17-36, 1990
 17. Roberts, A.B., Sporn, M.B. The transforming growth factor-beta. In: Sporn, M.B. and Roberts, A.B. *Peptide Growth Factors and Their Receptors*. Berlin: Springer-Verlag; 419-472, 1990
 18. Piche, J.E., Carnes, D.L., Graves, D.T. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 68:761-767, 1989
 19. Piche, J.E., Graves, D.T. Study of the growth factor requirements of human bone derived cells: A comparison with human fibroblasts. *Bone* 10:131-138, 1989
 20. Oates, T.W., Rouse, C.A., Cochran, D.L. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 64:142-148, 1993
 21. Dennison, D.K., Vallone, D.R., Pinero, G.J., Rittman, B. and Caffesse, R.G. Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 65: 641-648, 1994
 22. Nurse, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79:547-550, 1994
 23. Sherr, C. G1 phase progression:cycling on cue. *Cell* 79:551-555, 1994
 24. Kato, J.A., Matsuoka, M., Strom, D. and Sherr, C. Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* 14:2713-2721, 1994
 25. Leake, R. The cell cycle and regulation of cancer cell growth. *Ann N Y Aca Sci* 253-262, 1996
 26. Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71:505-514, 1992
 27. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parson, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825, 1993
 28. Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an

- associated 20K regulatory subunit. *Nature (London)* 366:707-710, 1993
29. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816, 1993
 30. Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211:90-98, 1994
 31. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature (London)* 366:701-704, 1993
 32. Zhang, H., Xiong, Y. and Beach, D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Cell Biol* 4:897-906, 1993
 33. Zhang, H., Hannon, G.J. and Beach, D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8:1750-1758, 1994
 34. Lukas, J., Muller, H., Bartkova, J., Spitkovsky, D., Kjerulff, A.A., Jansen-Durr, P., Strauss, M. and Bartek, J. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol* 125(3):625-638, 1994
 35. Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. and Pagano, M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15(5):2612-2624, 1995
 36. Tam, S.W., Theodoras, A.M., Shay, J.W., Draetta, G.F. and Pagano, M. Differential expression and regulation of cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with cdk4 is required for cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene* 9:2663-2674, 1994
 37. Resnitzky, D. and Reed, S.I. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol* 15(7):3463-3469, 1995
 38. Fisher, R.P. and Morgan, D.O. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78(8):713-724, 1994
 39. Makela, T.P., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Frutiger, S., Hughes, G.J. and Weinberg, R.A. A cyclin associated with the cdk-activating kinase MO15. *Nature (London)* 371:254-257, 1994
 40. Matsuoka, M., Kato, J.A., Fisher, R.P., Morgan, D.O. and Sherr, C. Activation of cyclin-dependent kinase-4(CDK4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol Cell Biol* 14(11):7265-7275, 1994
 41. Gartel, A.L., Serfas, M.S. and Tyner, A.L. p21-negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 138-149, 1996
 42. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature (London)* 366:701-704, 1993
 43. Zhang, H., Xiong, Y. and Beach, D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Cell Biol* 4:897-906, 1993
 44. Zhang, H., Hannon, G.J. and Beach, D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8:1750-1758, 1994
 45. Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F.B., Pan, Z.Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M. and Hurwitz, J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed

- by the DNA polymerase δ holoenzyme. Proc Natl Acad Sci 91(8): 8655-8659, 1994
46. Waga, S., Hannon, G.J. and Beach, D. and Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. Nature(London) 369:574-578, 1994
 47. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275, 1951
 48. Wrana, J.L., Sodek, J., Ber, R.L., Bellows, C.G. The effects of platelet derived transforming growth factor B on normal human diploid gingival fibroblasts. Eur J Biochem 159:69-76, 1986
 49. Anderson, T.J., Lapp, C.A., Billman, M.A., Schuster, G.S. Effects of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor on human gingival fibroblasts grown in serum-containing and serum-free medium. J Clin Periodontol 25: 48-55, 1998
 50. Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Gronwald, R., Minne, H., Ziegler, R. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: A comparison between insulin-like growth factor, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor B. Endocrinol 127:69-75, 1990
 51. Loef, E.B., Proper, J.A., Goustin, A.S., Shipley, G.D., DiCorleto, P.E., Moses, H.L. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor- β A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. Proc Nat Acad Sci(USA) 83:2453-2457, 1986
 52. Bategay, E.J., Raines, E.W., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Ross, R. TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine loop. Cell 63:515-524, 1990
 53. Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connel-Crowley, L., Swindell, E., Fox, M.P. and Wei, N. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. Mol Biol Cell 6:387-400, 1995
 54. Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. Genes Dev 7:1572-1583, 1993
 55. Chen, X., Bargonetti, J. and Prives, C. p53, through p21(WAF1/CIP1), induces cyclin D1 synthesis. Cancer Res 55(10):4257-4263, 1995
 56. Hiyama, H., Iavarone, A., LaBaer, J. and Reeves, S.A. Regulated ectopic expression of cyclin D1 induces transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 gene without altering cell cycle progression. Oncogene 14:2533-

사진부도

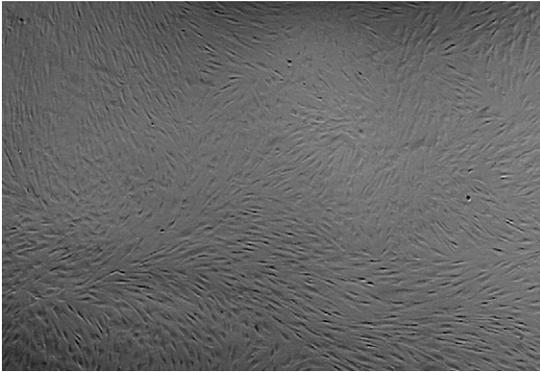


Photo 1, Cell density by light microscopic level after 3 days incubation supplemented with 10% FBS only($\times 40$).

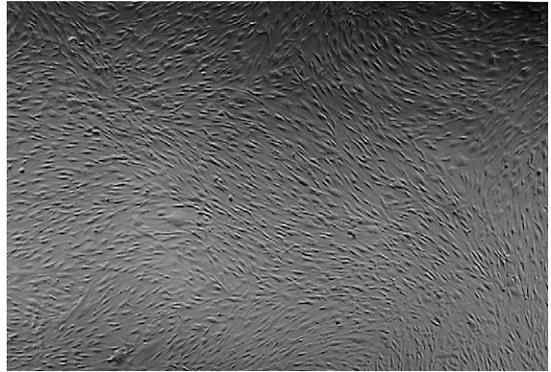


Photo 2, Cell density by light microscopic level after 3 days incubation supplemented with PDGF-BB($\times 40$).

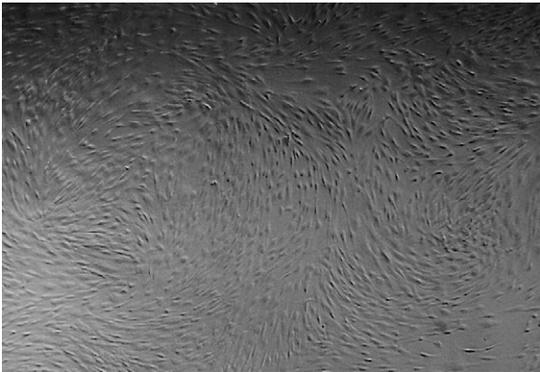


Photo 3, Cell density by light microscopic level after 3 days incubation supplemented with 10% TGF- $\beta 1$ ($\times 40$).

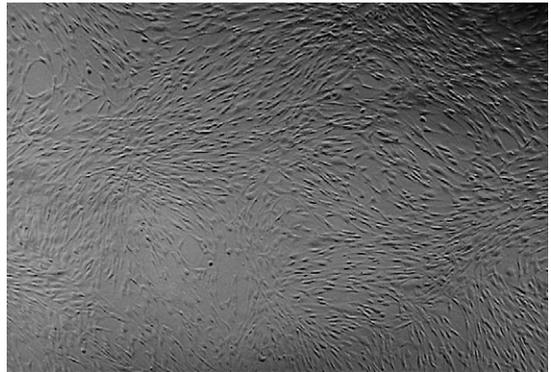


Photo 4, Cell density by light microscopic level after 3 days incubation supplemented with combination of PDGF-BB and TGF- $\beta 1$ ($\times 40$).

2542, 1997