

Bisphosphonate가 배양된 치주인대세포의 조골작용에 미치는 효과

김은영 · 김옥수 · 정현주

전남대학교 치과대학 치주과학교실 및 치의학 연구소

I. 서론

치주질환은 한 가지 또는 그 이상의 세균에 대한 숙주의 염증반응 및 면역반응에 의해서 일어나며 결합조직의 부착상실 및 치조골 상실을 동반한다. 이러한 치주질환을 치료하는 궁극적인 목표는 진행되는 질환을 정지시키고 이미 질환에 의해 파괴된 치주조직을 재생하여 그 기능을 회복시키는 것인데, 치주조직의 재생은 치조골 결손부로 치주인대세포 및 치조골세포의 빠른 이동과 결합조직내에 존재하는 세포의 치주인대세포와 치조골세포로의 분화의 정도에 의존한다.

치주인대세포는 섬유아세포, 조골유사세포, 파골세포, 백악아세포, 미분화 중배엽 세포들을 함유하고 있으며, 치유 과정 중 기능적으로 배열된 Sharpey's fiber가 신생 백악질과 치조골에 삽입되는 신부착을 형성하여 치주조직의 재생에 기여한다고 알려져 있다. 또한 치주인대세포는 높은 알칼리성 인산분해효소 활성도^{1,2)}, 제 I 형 교원질 생성 증가, 부갑상선 호르몬에 대한 cAMP 생성 증가, osteonectin 같은 단백질 생합성 등 골조직의 성장과 개조에 관여하는 조골세포와 유사한 성질을 가지고 있다³⁾.

골흡수 억제제인 bisphosphonate는 지나치게 골흡수가 증가되는 Paget's disease, 골다공증 등의 임상 치료제로 이용시 효과적으로 골흡수를 억제하며⁴

⁶⁾, 치주영역의 동물실험 연구에서도 치주질환으로 인한 치조골 흡수를 효과적으로 억제한다고 보고되었다^{4,5,7-10)}. 과거에는 etidronate disodium이 주로 사용되었는데 장기간 치료시 오히려 골연화증이 발생하는 부작용이 관찰되어, 최근에는 이보다 골흡수 억제 효과가 1000배 더 강력하여 골연화증의 부작용이 없는 alendronate sodium이 개발되어 사용되고 있다. bisphosphonate의 정확한 작용기전은 규명되지 않았지만 주로 파골세포에 작용하여 골흡수를 억제하며¹¹⁻¹⁵⁾, lactic acid 생산 억제^{16,17)}, proton 축적 억제¹⁴⁾, lysosomal enzyme 활성 억제¹⁸⁾, prostaglandin 합성 억제 효과 등이 그 기전으로 보고되고 있다¹⁹⁾.

Bisphosphonate의 파골세포에 의한 골흡수 억제와 파골세포 모집 억제 효과 외에도 조골세포에 대한 bisphosphonate의 직접적인 영향이 있으리라는 가정 하에 이 약제의 조골세포에 대한 효과도 연구되었다^{13,20-22)}. 그 중 Giuliani 등¹³⁾은 bisphosphonate가 조골전구세포 형성을 촉진한다고 보고하였으나, Garcia-Moreno 등²²⁾은 영향이 없다고 하였다. 치의학 영역에서는 bisphosphonate의 주요한 작용 기전인 골흡수 억제 효과 면에서만 연구가 진행되어 왔으며, 최근 Lekic 등²³⁾이 etidronate disodium를 사용한 쥐의 동물실험에서 미약하지만 치주인대세포의 분화를 촉진한다고 보고한 것이 유일한 연구이다.

본 연구에서는 배양된 사람의 치주인대세포에 골

흡수 억제제인 alendronate sodium과 etidronate disodium을 투여하여 이 약제가 치주인대세포의 조골 작용에 어떤 영향을 주는지 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 치주인대세포 배양

치주인대조직은 교정치료를 위하여 내원한 환자에서 발거된 제 3 대구치의 치근에서 채취하였다. 치근을 phosphate-buffered saline (PBS; Sigma, USA) 으로 3회 세척 후 중간 1/3부위의 치주인대를 큐렛이나 15번 수술도로 채취하여 2% 항생제(100 U/ml ampicillin, 100 μ g/ml streptomycin, Gibco, USA)가 포함된 PBS로 5회 세척하였다. 1 mm²로 세절한 다음 35 mm 세포 배양접시(Nunc, Denmark)에 배지 첨가없이 고르게 분산시켰다. 30분 동안 이산화탄소 배양기에 둔 다음 조직이 접시에 부착하면 1% 항생제 및 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, USA)을 첨가하였으며, 다음날 그리고 이후에는 3일마다 배지를 교환하여 20~30일 후 단일 세포층이 밀생(confluency)에 도달하면 PBS로 세척후 0.05% trypsin - 0.53 mM EDTA (Gibco, USA) 1 ml를 첨가하여 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 5분간 배양하였다. 세포가 배양접시로부터 분리되면 10% FBS가 함유된 DMEM을 동량 추가하여 반응을 중단시키고 원심분리하여 상층액을 버린후 얻어진 세포를 1% 항생제 및 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 현탁시킨 후 배양하였다. 세포들은 3일마다 계대 배양하였으며 4-6 세대의 세포를 실험에 사용하였다. 각각의 실험에서 배양된 세포들은 도립 위상차 현미경(Olympus, Japan) 하에서 관찰하였다.

2. 세포증식 및 세포 활성도 평가

96 well plate (Nunc, Denmark)의 각 well에 1×10^4 cell/200 μ l 밀도의 치주인대세포를 분주하고, 다음날 10^{-12} mol/L부터 10^{-6} mol/L 농도의 alendronate

sodium (Merk, USA) 이나 etidronate disodium(조당약품, 한국)을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 각각 교환하였다. 배지를 3일마다 교환하였으며 실험기간 중 도립 위상차 현미경 하에서 세포의 형태 변화를 계속 관찰하고 사진 촬영하였다. 배양 2일, 7일에 trypan blue 염색 후 세포 수를 세었고 MTT (Dimethyl thiazol-2-YL-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 검사를 시행하였다. 세포는 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척한 다음 배양접시로부터 세포를 분리시켜 0.4% trypan blue (Gibco, USA)로 염색하여 수를 세었다. MTT 검사를 위하여 배양접시 내 배지의 1/10인 20 μ l MTT (Sigma, USA)를 첨가하여 3시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였으며, 3시간 후 MTT 용액을 제거한 다음 DMSO (Dimethyl sulfoxamide, Sigma, USA) 50 μ l씩 첨가하여 fumazone 결정을 녹여 ELISA 판독용 immuno-plate (Nunc, Denmark)에 옮긴 후 ELISA reader (Emax precision microplate reader, Molecular Devices Corp., USA) 를 이용하여 630 nm를 기준으로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 4배수 실시하였다.

3. 알칼리성 인산분해효소 활성도 평가

96 well plate의 각 well에 1×10^4 cell/200 μ l 밀도의 치주인대세포를 분주하고, 다음날 10^{-1} mol/L의 간격으로 10^{-12} mol/L부터 10^{-6} mol/L 농도의 alendronate sodium이나 etidronate disodium을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 각각 교환하였다. 배지를 3일마다 교환하였으며, 배양 2일과 5일 후에 효소 활성도 검사를 시행하였다. 배양접시로부터 배지를 제거한 후 PBS로 세척한 다음 1% Triton-X 100 (Sigma, USA) 50 μ l를 첨가하고 20분간 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하여 세포를 용해시켰다. 40 μ l 표본에 알칼리성 인산분해효소 검사액(Sigma, USA)을 첨가하여 405 nm에서 1분, 2분 후의 p-NPP (4 mM p-nitrophenyl phosphate) 비색반응을 측정하였다.

4. 석회화 결절 수 평가

96 well plate의 각 well에 2×10^4 cell/500 μ l DMEM 밀도의 치주인대세포를 분주하고, 다음날 10^{-1} mol/L의 간격으로 10^{-12} mol/L부터 10^{-6} mol/L 농도의 alendronate sodium이나 etidronate disodium을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 각각 교환하였다. 배지에는 석회화 결절을 유도하기 위해 50 μ g/ml의 ascorbic acid, 10 mM의 β -glycerophosphate (Sigma, USA), 10^{-7} M의 dexamethasone (Sigma, USA)을 첨가하였다. 배지를 3일 마다 교환하면서 28일 간 배양하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 세척한 다음 3% formalin - PBS solution 500 μ l를 첨가하여 10분 동안 실온에서 고정시켰다. PBS로 2회 세척하고 건조시킨 후 Ca^{++} 에 대한 염색을 위하여 2% alizarin red 용액(pH 4.1-4.3, Sigma, USA)에 15분 간 실온에서 담근 다음, 증류수로 3회 세척하여 도립 위상차 현미경 하에서 염색된 석회화 결절 수를 세었다.

III. 결과

1. 치주인대세포의 형태 변화

1) Alendronate sodium

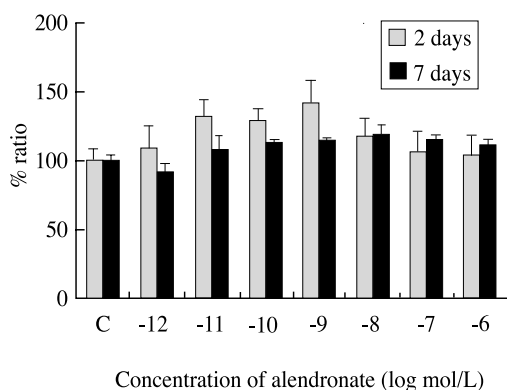


Figure 1. Effect of alendronate on the proliferation of human periodontal ligament cells (C : control).

배양 2일 후의 세포형태는 대조군과 유사한 방추형의 모양으로 유지되었으나, 7일 후에는 10^{-9} mol/L 이상의 농도에서 세포들은 서로 응집되어 집락을 이루었다. 2주 이후에는 10^{-10} mol/L 이상의 농도에서 세포들이 집락을 이루었고, 그 이하의 농도에서는 대조군과 유사하게 밀생을 유지하였다(Photo 1, 2).

2) Etidronate disodium

배양 2일 후의 세포형태는 대조군과 유사한 방추형의 모양으로 유지되었으나, 7일 후에는 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ mol/L의 농도에서 집락을 이루었고, 그 이하의 농도에서는 대조군과 유사하게 밀생을 유지하였다(Photo 3).

2. 치주인대세포의 증식 및 활성도에 대한 효과

1) Alendronate sodium

배양 2일 후 치주인대세포는 모든 농도에서 대조군에 비해 증식이 증가하는 경향을 보였으며 10^{-9} mol/L에서 가장 크게 증식하였다. 배양 7일 후에는 대조군과 유사한 양상을 보인 10^{-12} mol/L을 제외한 모든 농도에서 증식이 증가하는 경향을 보였으며 10^{-8} mol/L에서 가장 크게 증식하였다. MTT 검사에 의한 세포활성도는 배양 2일 후 대조군과 유사하였다. 배양 7일 후에는 모든 농도에서 대조군에 비해 세포 활성도가 전반적으로 낮았다(Figure 1, 2).

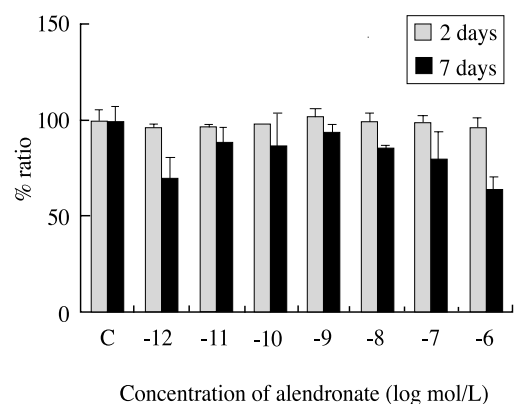


Figure 2. Effect of alendronate on the cellular activity of human periodontal ligament cells (C : control).

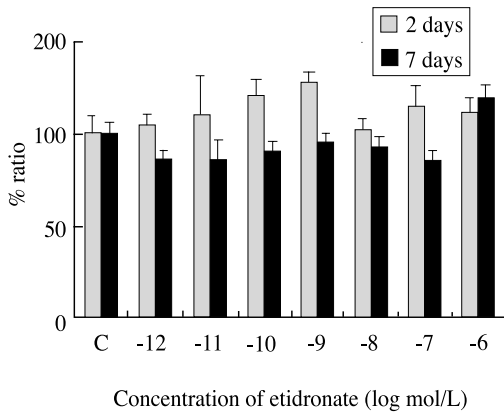


Figure 3. Effect of etidronate on the proliferation of human periodontal ligament cells (C : control).

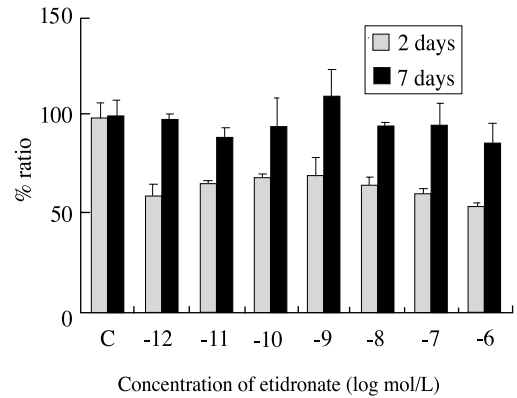


Figure 4. Effect of etidronate on the cellular activity of human periodontal ligament cells (C : control).

2) Etidronate disodium

배양 2일 후 모든 농도에서 대조군에 비해 치주인대세포의 증식이 증가하는 경향을 보였으며 10^{-9} mol/L에서 가장 크게 증식하였다. 배양 7일 후에는 10^{-6} mol/L에서 대조군에 비해 증식이 증가하는 경향을 보였으나 그 외의 모든 농도에서 대조군에 비해 약간 낮거나 유사하였다. MTT 검사에 의한 세포 활성도는 배양 2일 후 모든 농도에서 대조군에 비해 낮

았으며, 배양 7일 후에는 대조군에 비해 전반적으로 낮은 양상을 보였다(Figure 3, 4).

3. 치주인대세포의 알카리성 인산분해효소 활성도에 대한 효과

1) Alendronate sodium

배양 4일 후 치주인대세포는 10^{-7} , 10^{-6} mol/L에서 대조군과 유사한 활성도를 보였으며 그 외의 모든

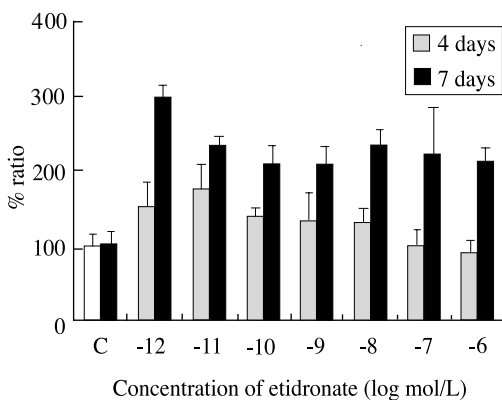


Figure 5. Effect of alendronate on the alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells (C : control).

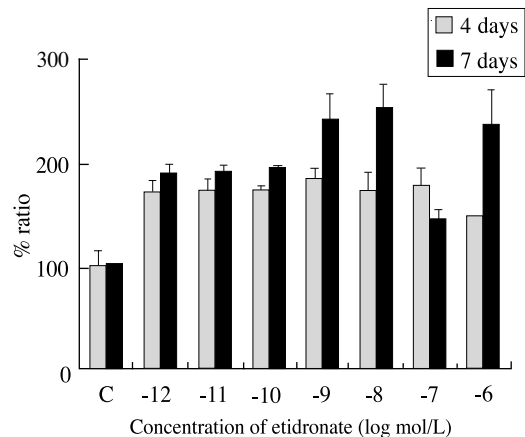


Figure 6. Effect of etidronate on the alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells (C : control).

농도에서 활성도가 증가하는 경향을 보였고 10^{-11} mol/L에서 가장 큰 값을 나타내었다. 배양 7일 후에는 모든 농도에서 활성도가 증가하였고 10^{-12} mol/L에서 가장 큰 값을 나타내었다(대조군에 비해 2배)(Figure 5).

2) Etidronate disodium

배양 4일 후 치주인대세포는 대조군에 비해 모든 농도에서 활성도가 증가하였다. 배양 7일 후에는 대조군에 비해 모든 농도에서 증가하였고 10^{-8} mol/L에서 가장 큰 값을 나타내었다(대조군에 비해 1.6배)(Figure 6).

4. 치주인대세포의 석회화 결절 형성에 대한 효과

대조군의 경우 석회화 결절 유도물질을 첨가하여 배양한 후 alizarin red로 염색한 결과 bisphosphonate 보다 수는 적지만 오렌지색으로 염색된 결절이 관찰되었다(Photo 4).

1) Alendronate sodium

석회화 결절 유도물질을 첨가하여 배양한 후 alizarin red로 염색한 결과 뚜렷한 원형으로 주위에

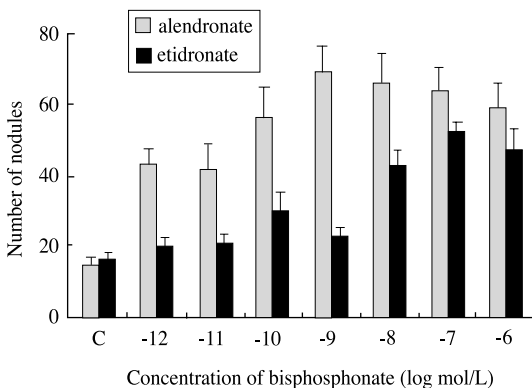


Figure 7. Effect of bisphosphonate on formation of mineralized nodules by human periodontal ligament cells (C: control).

세포가 밀집되어 있고 중앙은 진한 오렌지색으로 염색된 결절이 관찰되었다(Photo 5).

석회화 결절 수는 모든 농도에서 대조군에 비해 증가하였으며 10^{-9} mol/L에서 가장 큰 값을 나타내었다(대조군에 비해 3.8배)(Figure 7).

2) Etidronate disodium

Alendronate sodium에서 형성된 결절보다 약간 더 크지만 경계가 명확하지 않으며 중앙은 오렌지색으로 염색된 결절이 관찰되었다(Photo 6).

석회화 결절 수는 모든 농도에서 대조군에 비해 증가하였으며 10^{-7} mol/L에서 가장 큰 값을 나타내었다(대조군에 비해 2.3배)(Figure 7).

IV. 고찰

치주질환을 치료하고 예방하기 위해서는 주로 세균을 감소시키기 위하여 치석제거술, 치근면활택술, 치주관막술을 통한 기계적인 처치⁴⁾와 숙주의 염증 반응을 조절하기 위하여 prostaglandin, IL-1 β 등의 염증조작내의 화학물질 생성을 차단하는 비스테로이드성 소염제 등이 이용되고 있다²⁴⁻²⁷⁾. 치조골과 치주인대 재생을 위하여 차폐막을 이용한 조직유도재 생식식이 개발되어 이용되고 있으며, 치주인대세포의 증식과 분화를 유도하는 것으로 알려진 PDGF-BB, IGF-1, TGF- β 등의 성장인자와 관련된 연구도 시행되고 있다^{28,29)}. 또한 치주조직의 재생과 임플란트 매식후 치유에는 치조골의 재생이 중요하므로 골형성의 기본은 전구세포를 골형성세포로 자극, 분화하는 것인데, Lin 등³⁰⁾은 쥐의 발치후 치유과정에서 치주인대세포가 빠르게 발치와로 이주, 증식하여 새로운 골을 형성하는 치조골세포로 분화한다고 보고하였다.

골흡수 억제제인 bisphosphonate는 골다공증 같은 지나치게 골흡수가 증가되는 질환의 치료제로 이용되고 있으며, 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았지만 주로 파골세포에 작용하여 골흡수를 억제한다고 보고되었다¹¹⁻¹⁵⁾. 치주질환에서 골흡수와 골형성의 조화가 파괴되어 치조골 소실이 일어난다는 것에 착

안하여 골흡수를 억제하는 약제를 이용한 연구들에 의하면 bisphosphonate가 동물실험에서 치주질환으로 인한 치조골 흡수를 효과적으로 억제한다고 보고되고 있다^{4,5,7-10}. 또한 Igarashi 등³¹은 쥐 실험에서 bisphosphonate을 국소적으로 치조골막에 주사한 후 교정력을 가했을 때 치아아동이 억제됨을 보고하였고, Teronen 등³²은 bisphosphonate가 임플란트 주위의 치은열구내에서 중성백혈구성 교원질분해효소(neutrophil collagenase MMP-8)을 억제하여 골흡수 및 연조직과 치주인대 파괴를 예방할 수 있다고 하였다. Meraw 등³³과 Meraw와 Reeve³⁴는 발치 직후 임플란트 매식한 경우 bisphosphonate에 일주간 처치한 임플란트가 임플란트 주위의 초기 골형성과 치조골과의 직접부착을 증가시킨다고 보고하여, bisphosphonate가 치주조직과 치조골의 재생과 형성에 중요한 역할을 한다는 가능성이 제시되고 있다.

세포의 조직화학적 연구에서 골결절을 형성하고 골재생이 성공적으로 일어나려면 1) 세포의 여러층을 형성하는 세포 증식단계, 2) 세포가 분화되면서 세포표면의 변화, 3) 기질형성과 성숙, 세포합입 과정을 동반한 세포활성 그리고 4) 활성화된 골표면과 성숙된 골세포를 동반한 피질골의 석회화가 일어나야 한다³⁵.

최근 Garcia-Moreno 등²²은 사람의 조골세포에 $10^{-12} \sim 10^{-1}$ mol/L 농도의 alendronate sodium을 첨가하여 배양한 결과 조골세포의 활성, 증식률, 석회화 능력에 영향을 미치지 않는다고 보고한 반면, Giuliani 등¹³은 쥐와 사람의 골수세포에 $10^{-14} \sim 10^{-5}$ mol/L 농도의 alendronate sodium과 $10^{-13} \sim 10^{-4}$ mol/L 농도의 etidronate disodium을 첨가하여 배양한 결과 조골전구세포로의 분화 및 석회화 결절 형성을 촉진한다고 보고하는 등 상반된 결과를 보였다. 또한 Lekic 등²³은 etidronate disodium 5×10^{-5} mol/L, 2×10^{-4} mol/L을 첨가한 흰쥐의 동물실험에서 bisphosphonate가 치주인대세포의 특이성 조골세포계열에 선택적으로 작용하여 미약하지만 조골성 표현형으로 모집, 분화를 촉진한다고 보고하였다. 본 실험에서는 이들 보고에 근거하여 골흡수 억제제중 최근 가장 많이 사용되는 alendronate sodium과 임상에서 가장 오랫동안

안 사용되어 온 etidronate disodium을 $10^{-12} \sim 10^{-6}$ mol/L 농도로 첨가한 배지에 사람의 치주인대세포를 배양하여, 치주조직과 치조골의 재생과 형성에 주된 작용을 하는 치주인대세포의 조골작용에 대한 bisphosphonate의 효과를 알아보고자 하였다.

치주인대세포의 세포 증식 및 세포 활성화에 미치는 효과를 측정한 결과, alendronate sodium을 처치한 경우 세포 증식은 배양 2일 후 모든 농도에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, 배양 7일 후에는 대조군과 유사한 양상을 보였다. 세포 활성화도는 배양 2일, 7일 후 모든 농도에서 대조군보다 다소 낮거나 유사한 양상을 보였다. Etidronate disodium을 처치한 경우 세포 증식은 배양 2일 후 모든 농도에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, 배양 7일 후에는 대조군과 유사한 양상을 보였다. 세포 활성화도는 배양 2일, 7일 후 모든 농도에서 대조군보다 다소 낮거나 유사한 양상을 보였다. 본 연구에서 관찰된 세포 증식이 증가된 경향은 Giuliani 등¹³이 사람과 쥐의 골수세포를 배양하여 alendronate sodium과 etidronate disodium을 투여하였을 때 초기의 조골전구세포인 섬유아세포 집락형성단위 수가 증가한다는 보고와 유사하였다.

알카리성 인산분해효소는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로, 세포의 외기질에 인산 칼슘을 침착시킴으로써 석회화를 유도하는 기능을 갖는다^{36,37}. DeBernard³⁸는 알카리성 인산분해효소가 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인산단백으로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가지면서 인산단백질이 석회화의 핵으로서의 역할을 한다고 하였다. 이러한 골관련 단백질은 칼슘염과 인산염에 결합하는 성질을 가지며, 수산화인회석에 대한 친화성이 높은 특징을 보이기 때문에, 수산화인회석 결정체 형성의 핵으로 작용하여 핵의 성장과 용해와 같은 조절과정에도 관여한다³⁹. 본 연구에서 치주인대세포의 알카리성 인산분해 효소에 미치는 효과를 측정한 결과, alendronate sodium과 etidronate disodium을 처치한 경우의 모든 농도에서 대조군보다 효소 활성화도가 증가하는 경

향을 보여 골형성 후 석회화 능력이 증가될 수 있음을 반영하였다.

치주인대세포의 석회화 결절형성 과정은 1) 세포 밀도가 치밀한 단층을 이루는 단계, 2) 계속적인 세포의 분열로 세포가 중층을 이루는 부위가 나타나는 단계(7일), 3) 세포가 밀집된 부위에 결절이 형성되는 단계(14일) 그리고 4) 결절부위에 광물화가 이루어지는 단계(19일)의 네 단계로 구성된다⁴⁰⁾. Cho 등⁴¹⁾은 쥐를 이용한 동물실험에서 치주인대세포에 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate, 5 μM dexamethasone을 첨가하여 배양하였을 때 석회화 결절이 형성되었다고 보고하였다. Mukai 등⁴²⁾은 이 석회화 결절내에 조골세포나 골세포와 유사한 세포들과 교원기질, 기질낭포가 존재하며 이 결절이 수산화인회석의 결정구조를 가진다고 하였고, 치주인대세포 내에는 조골세포로 분화하여 골과 유사한 조직을 형성할 수 있는 골전구세포가 존재한다고 보고하였다. 본 연구에서 치주인대세포의 석회화 결절 형성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 결절유도 물질을 배지에 첨가하여 배양한 결과, alendronate sodium과 etidronate disodium을 처리한 경우의 모든 농도에서 대조군에 비해 석회화 결절 수가 증가하였다. 이 결과는 Giuliani 등¹³⁾이 사람과 쥐의 골수세포를 배양하였을 때 alendronate sodium과 etidronate disodium 모두 후기의 조골전구세포인 조골세포 집락형성 단위 수가 증가한다는 보고와 비슷하였다.

Bisphosphonate의 파골세포 억제기전¹¹⁻¹⁵⁾과 Giuliani 등¹³⁾의 조골세포의 전구세포 형성 촉진과 석회화 결절 형성 증가 보고, 실험적 치주질환으로 인한 치조골 상실 억제 효과 보고^{4,5,7-10)}, 실험적 교정력에 대한 저항³¹⁾ 및 임플란트 매식후 치조골 흡수 억제 효과 보고³²⁻³⁴⁾, 그리고 Lekic 등²³⁾의 치주인대세포의 분화를 촉진한다는 보고 등과 함께, 본 연구의 치주인대세포에 대한 세포 증식과 알칼리성 인산분해 효소 활성도 및 석회화 결절 형성 증가는 bisphosphonate가 치주조직과 골조직의 재생과 형성에 기여할 수 있음을 시사하였다. 따라서 골다공증 환자의 치주치료와 골재생 치료 및 임플란트 매식을 위하여 발치후 치조골의 흡수를 억제하고 임플란트 매식후

치조골의 흡수 억제 및 초기의 골형성을 촉진하도록 bisphosphonate의 적극적인 투여가 고려될 수 있다.

본 연구로부터 alendronate sodium은 10^{-12} ~ 10^{-8} mol/L, etidronate disodium은 10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L 농도에서 치주인대세포의 증식, 알칼리성 인산분해효소 및 석회화 결절 형성을 증가시키는 효과를 지닐 수 있었다. 이에 근거하여 세포의 정상 기능을 유지할 수 있고, 기대하는 임상적 효과가 나타날 수 있는 농도를 선정하여 동물실험을 통한 bisphosphonate의 치주인대세포 조골작용에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

Bisphosphonate가 치주인대세포의 조골작용에 미치는 효과를 알아보기 위하여 세포 증식과 세포 활성도 및 알칼리성 인산분해효소 활성도, 그리고 석회화 결절 형성 양상을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Alendronate sodium의 영향

세포 증식은 배양 2일, 7일 후 본 연구에서 사용된 모든 농도에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다. 세포 활성도는 배양 2일 후 대조군과 유사하였으며, 7일 후는 대조군에 비해 전반적으로 낮았다. 반면 알칼리성 인산분해효소 활성도는 배양 4일, 7일 후 모든 농도에서 대조군보다 증가하는 경향을 보였으며, 석회화 결절 수도 모든 농도에서 대조군보다 증가하였다.

2. Etidronate disodium의 영향

세포 증식은 배양 2일 후 모든 농도에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, 배양 7일 후에는 대조군에 비해 낮거나 유사하였다. 세포 활성도는 배양 2일, 7일 후 전반적으로 대조군보다 낮았다. 반면 알칼리성 인산분해효소 활성도는 배양 4일, 7일 후 모든 농도에서 대조군보다 증가하는 경향을 보였으

며, 석회화 결절 수도 모든 농도에서 대조군보다 증가하였다.

이상의 연구 결과로 볼 때 bisphosphonate는 치주 인대세포의 세포 활성도를 어느 정도 유지시키는 반면, 세포증식, 알카리성 인산분해효소 활성도 및 석회화 결절 형성을 증가시키는 효과를 지녀 치주조직 및 골조직의 재생에 기여할 수 있을 것으로 추정되었다.

VI. 참고 문헌

1. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol* 62:499-503, 1991
2. Yamashita Y, Sato M, Noguchi T : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Oral Biol* 32:677-678, 1987
3. Somerman MJ, Young MF, Foster RF, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ : Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archs Oral Biol* 35:240-247, 1990
4. Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, Aufdemorte TB, Wood R : Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol* 63:825-830, 1992
5. Shoji K, Horiuchi H, Shinoda H : Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res* 30:277-284, 1995
6. Fleisch H : The possible use of bisphosphonates in osteoporosis. In: Deluca HF, Mazess R, eds. *Osteoporosis : Physiological basis, assessment, and treatment*. Amsterdam: Elsevier 323-329, 1990
7. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chares E, Kornman KS, Rodan GA : Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodont Res* 29:35-40, 1994
8. Reddy MS, Weatherford III TW, Smith CA, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM : Alendronate treatment of naturally - occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol* 66:211-217, 1995
9. Yaffe A, Fine N, Alt I, Binderman I : The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 66:999-1003, 1995
10. Yaffe A, Izkovich M, Earon Y, Lilov R, Binderman I : Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol* 68:884-889, 1997
11. Fleisch H : Bisphosphonates - history and experimental basis. *Bone* 8:s23-s28, 1987
12. Fleisch H : Bisphosphonates - pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcemic and metastatic bone disease. *Drugs* 42:919-944, 1991
13. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G : Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 22:455-461, 1998
14. Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC : Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclast in vitro. *J Clin Invest* 85:456-461, 1990
15. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA : Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure.

- J Clin Invest 88:2095-2105, 1991
16. Fast DK, Felix R, Dowse C, Newman WF, Fleisch H : The effects of diphosphonates on the growth and glycolysis of connective-tissue cells in culture. *Biochem J* 172:97-107, 1978
 17. Shinoda H, Adamek G, Felix R, Fleisch H, Schenk R, Hagan P : Structure-activity relationship of various bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 35:87-99, 1983
 18. Felix R, Russell RGG, Fleisch H : The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 429:429-438, 1976
 19. Felix R, Bettex JD, Fleisch H : Effect of diphosphonates on the synthesis of prostaglandins in cultured calvaria cells. *Calcif Tissue Int* 33:549-552, 1981
 20. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugai N, Yamamoto M, Nagata N : Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 18:9-14, 1996
 21. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ : Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 91:2004-2011, 1993
 22. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farre M, Diez A, Marinoso ML, Carbonell J, Mellibovsky L, Nogues X, Ballester J, Aubia J : Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 22:233-239, 1998
 23. Lekic P, Rubbino I, Krasnoshtein F, Cheifetz S, McCulloch CAG, Tenenbaum H : Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *The Anatomical Record* 247:329-340, 1997
 24. Michael B, Carol NB : Antimicrobial agents in prevention and treatment of periodontal disease. *Dent Clin North America* 217-241, 1988
 25. Jeffcoat MK, Williams RC, Reddy MS, English R, Goldhaber P : Flurbiprofen treatment of human periodontitis : Effect on alveolar bone height and metabolism. *J Periodont Res* 23:381, 1988
 26. Howell RC, Jeffcoat MK, Goldhaber P, Reddy MS, Kaplan ML, Johnson HG, Hall CM, Williams RC : Inhibition of alveolar bone loss in beagles with the NSAID naproxen. *J Periodont Res* 26:498-501, 1991
 27. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Reddy MS, Johnson HG, Hall CM, Goldhaber P : Ibuprofen : An inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *J Periodont Res* 23:225-229, 1988
 28. Oates TW, Rouse CS, Cochran DL : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 64:142-148, 1993
 29. Dennison DK, Valon DR, Pinero GI, Rlttman B, Caffesse RG : Differential effect of TGF- β and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblast. *J Periodontol* 65:641-648, 1994
 30. Lin WL, McCulloch CA, Cho MI : Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec* 240:492-506, 1994
 31. Igarashi K, Mitani H, Adachi H, Shinoda H : Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate(AHBP) on tooth movements in rats. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 106:279-289, 1994
 32. Teronen O, Konttinen YT, Lindqvist C, Salo T, Ingman T, Lauhio A, Ding Y, Santavirta S, Sorsa T : Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. *J Dent Res* 76:1529-1537, 1997
 33. Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC : Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J Periodontol* 70:151-158, 1999

34. Meraw SJ, Reeve CM : Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. *J Periodontol* 70:1228-1233, 1999
35. Nefussi JR : Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem* 45:493-503, 1997
36. Beertsen W, Van den Bos T : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum : The role of alkaline phosphatase. *Matrix* 9:159-171, 1989
37. Bellows CG, Aubin JE, Heershe JNM : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro : The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Mineral* 14:27-40, 1991
38. DeBernard B : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. *Clin Orthop* 162:233-244, 1982
39. Nagata T, Bellows CG, Kasugai S, Butler WT, Sodek J : Biosynthesis of bone protein [SPP-1(secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP(bone sialoprotein) and SPARC(osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. *Biochem J* 274:513-520, 1991
40. Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI : Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 57:52-59, 1995
41. Cho MI, Matsuda N, Lin WL, Moshier A, Ramakrishnan PR : In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif Tissue Int* 50:459-467, 1992
42. Mukai M, Yoshimine Y, Akamine A, Maeda K : Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res* 271:453-460, 1993

사진부도 설명

- Photo 1. Control group after 7 days of culture. Cells were confluent(X40).
- Photo 2. Alendronate sodium group at the concentration of 10^{-9} mol/L after 7 days of culture. Cells were aggregated, not confluent(X40).
- Photo 3. Etidronate disodium group at the concentration of 10^{-7} mol/L after 7 days of culture. Cells were aggregated, not confluent(X40).
- Photo 4. Control group after 28 days of culture.
The fewer mineralized nodules stained with red orange color were seen compared to bisphosphonate group.
- Photo 5. Alendronate sodium group at the concentration of 10^{-9} mol/L after 28 days of culture. The mineralized nodules stained with red orange color were surrounded by cells. The more round shaped nodules with clear margin than the nodules in etidronate group were seen(X40).
- Photo 6. Etidronate disodium group at the concentration 10^{-7} mol/L after 28 days of culture. The larger, irregular shaped mineralized nodules stained with red orange color were seen compared to alendronate group(X40).

사진부도(1)

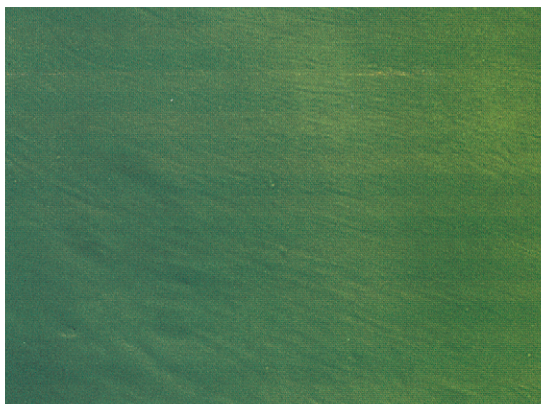


Photo 1

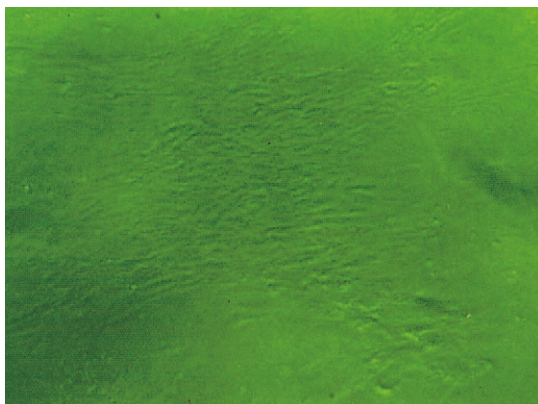


Photo 2

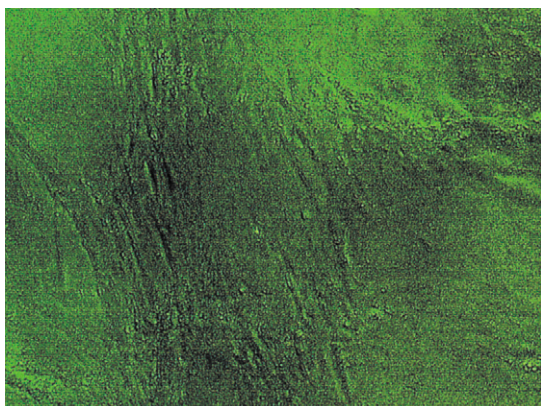


Photo 3

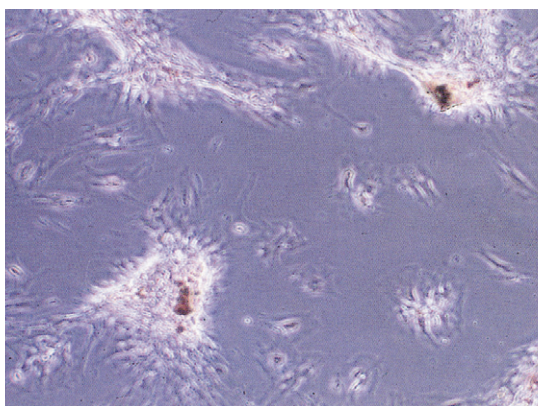


Photo 4

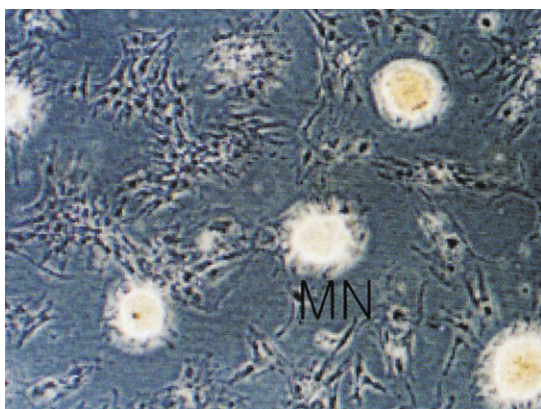


Photo 5

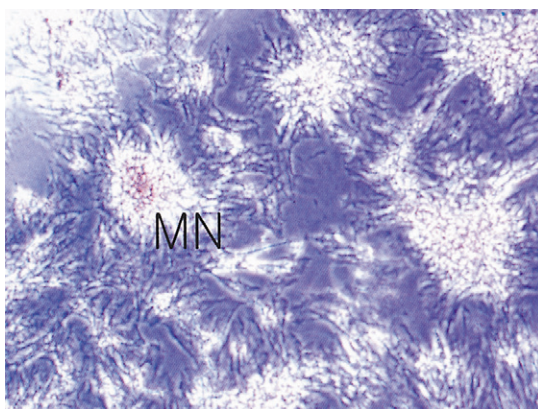


Photo 6

Effect of Bisphosphonate on Osteoblastic Activity of the Human Periodontal Ligament Cells *in Vitro*

Eun-Young Kim, Ok-Su Kim, Hyun-Ju Chung

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Research Institute of Dental Science
Chonnam National University

Previous studies have demonstrated an increase in bone mass and density with use of bisphosphonate in osteoporosis. This agent acts as an inhibitor of osteoclastic activity and results in increase of net osteoblastic activity.

The purpose of the present study was to examine the effect of the bisphosphonate on osteoblastic activity of the human periodontal ligament cells *in vitro*. Periodontal ligament cells were primarily obtained from extracted healthy third molars. Cells of 4th to 6th passage were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing alendronate sodium or etidronate disodium at the concentration of $10^{-12} \sim 10^{-6}$ mol/L in 5% CO₂ incubator at 37°C. Cell count and MTT assay for cellular activity were done at 2 to 7 days of culture. Alkaline phosphatase activity at 4 to 7 days of culture and formation of mineralized nodules at 28 days of culture with addition of 50 µg/ml ascorbic acid, 10 mM β-glycerophosphate, 10^{-7} M dexamethasone were evaluated.

1. Alendronate sodium

Compared to the control, the proliferation of periodontal ligament cells was generally increased and the cellular activity was maintained at 2 days of culture and generally decreased at 7 days of culture. Alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells was increased and the formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells was enhanced compared to the control.

2. Etidronate disodium

The proliferation of periodontal ligament cells was increased at 2 days of culture and decreased or maintained at 7 days of culture. Compared to the control, the cellular activity of periodontal ligament cells was generally decreased. Alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells was increased and the formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells was enhanced compared to the control.

These results suggest that alendronate sodium and etidronate disodium may have a potential effect on osteoblastic lineage of periodontal ligament cells, distinct from their inhibitory action on osteoclasts and could contribute to enhance periodontal regeneration and alveolar bone regeneration.