

Platelet-derived growth factor가 조골세포의 활성에 미치는 영향

최형호 · 김정근 · 임성빈 · 정진형

단국대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

성장인자란 유사분열 활성을 갖는 polypeptide로 정의되는데 자신이 작용하는 세포에서 분비되든지 (autocrine factor), 인접 세포에서 분비되어지든지 (paracrine factor) 다양한 조직 및 세포에서 합성된다¹⁾. 수 많은 종류의 polypeptide계 성장인자 중 창상 치유에 관여하는 성장인자로서 혈소판유래 성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF), 섬유아세포 성장인자(Fibroblast growth factor), 변형 성장인자(Transforming growth factor), 인슐린-유사 성장인자(Insulin-like growth factor), 상피 성장인자(Epidermal growth factor)와 interleukin-1 등이 있으며 이들은 국소부위에서 중배엽세포를 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다²⁾. 이중 PDGF가 조직 재생에 가장 큰 영향을 줄 수 있는 것으로 보고되고 있다. PDGF는 분자량이 28-35 KDa의 조절성 단백질³⁻⁴⁾로서 Ross⁵⁾ 와 Kohler와 Lipton⁶⁾에 의하여 발견되었고 Antoniades⁷⁾에 의하여 분리되어 개발 명명되었으며 단종이량체(PDGF-AA, BB)와 이종이량체(PDGF-AB)가 발견되었다⁸⁾. PDGF는 혈소판의 α granule로부터 유리된다고 알려져 있고⁹⁾ 혈소판 이외에 단핵세포 및 대식세포, 섬유아세포, 내피세포, 골기질 등으로부터 분리된다고 알려져 있으며 중배엽의 세포 즉 섬유아세포, 신경세포, 평활근세포, 골

세포를 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다고 알려졌다^{6, 10)}. 이러한 PDGF는 중성구, 단핵세포 그리고 섬유아세포에 대해 화학주성이 있으며¹¹⁻¹²⁾ fibronectin, 교원질 분해효소와 다른 성장인자들의 합성을 포함하는 창상 치유과정에 있어서 주된 역할을 하는 세포들을 자극시키는 것으로 알려져 있다¹³⁻¹⁴⁾. Cochran 등¹⁵⁾은 PDGF-BB가 신생쥐의 두 개골에서 골기질 축적속도를 억제한다고 보고하였고, Canalis 등¹⁶⁾은 PDGF-BB가 interstitial collagenase의 증가에 의한 교원성 단백질분해를 증가시킨다고 보고하였으며, Centrella와 McCarthy¹⁷⁾는 백서 두개골에서 배양된 조골세포에 PDGF-BB적용시 DNA, 교원질 및 비교원성 단백질의 합성이 증가된다고 보고하였다. 또한 Lynch 등¹⁷⁾은 PDGF-BB를 쥐에 전신적 투여시 골밀도 및 골격의 강도가 증가되었다고 보고하였다. 생체실험에서 Lynch 등¹⁸⁾은 돼지의 피부 창상부위에 PDGF-BB 적용시 적용농도에 따라 신생결체조직과 내피층의 두께가 증가됨을 관찰하였다.

Rutherford 등¹⁹⁾은 PDGF가 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포의 증식을 촉진하였다고 보고하였고, Matsuda 등²⁰⁾은 배양된 쥐의 치주인대세포에 PDGF 적용시 세포증식, 화학주성, 교원질 합성을 증가시킨다고 보고하였으며, Oates 등²¹⁾은 PDGF가 사람의 치주인대세포에 주된 유사분열 촉진인자로 작용한다고 주장하였다. Piche와 Graves²²⁾

는 골유래세포 배양시 PDGF를 첨가한 경우 세포 증식률이 촉진된다고 보고하였다.

Rutherford¹⁹⁾와 Giannobile 등²³⁾은 PDGF-BB를 IGF-1과 함께 사용할 때 치주인대 세포의 DNA합성에 대해 상승효과를 나타낸다고 보고하였고, Lynch 등²⁴⁾은 PDGF-BB 및 IGF가 치주인대세포를 자극하므로 치주조직재생에 효과가 있으며 이들 두 성장인자를 혼용시 상승효과가 있다고 보고하였다.

PDGF는 매우 분화된 골세포에서 생성되며²⁵⁾ 골조직내에서 초기와 후기 분화단계의 세포분열을 증가시키며 치유반응에서 중요한 역할을 한다. 또한 PDGF는 골조직과 골세포 배양에서 교원섬유 합성을 증가시키며 세포분열을 증가시키는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 골조직 배양에서 성장촉진 영향 이외에도 PDGF는 신생 마우스의 두개관의 배양에서 골흡수를 촉진시키며 이러한 증가는 cyclo-oxygenase 활성을 억제함으로써 prostaglandin의 합성을 방해하는 것으로 여겨진다²⁶⁾. PDGF가 직접 파골세포에 작용한다는 증거는 아직 알려져 있지 않다. 따라서 골조직내의 어떠한 다른 매개물질에 의해 골흡수의 증가가 일어나리라 여겨진다.

골기질을 합성하며 활발한 대사작용으로 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 조골세포는 골표면에 근접한 세포질내에 과립형질내세막이 발달해 있고, 핵 주위로 골지체가 위치하며, 골지체 바깥 세포질에 사립체가 존재하며²⁷⁾, 세포막에 당 단백질소인 염기성 인산 분해효소를 갖고 있다. 또한 조골세포내에 미체소관²⁸⁾과 5-7nm의 미세사²⁹⁾가 존재하며, 용해소체도 존재한다고 알려져 있다³⁰⁻³¹⁾. 또한 조골세포는 많은 표현형의 특징을 가지고 있다. 즉 제1형 교원섬유의 생합성³²⁾, 높은 염기성 인산 분해효소 활성도, PTH-의존형 adenylate cyclase 활성, prostaglandin E₂ 합성, osteonectin, osteopontin³³⁾, bone phosphoproteins³⁴⁾, proteoglycan과 collagenase의 생합성, 1,25(OH)₂D₃-의존형 osteocalcin합성³⁵⁾ 등이 있다. 따라서 조골세포의 표현형의 특징들은 성장인자에 대한 반응을 측정하기에는 유용하나 그 이전에 다양한 세포형의 분화와 발현정도의 기본 상태를 인식하는 것이 필수적이다.

치주재생에 있어서 성장인자의 화학주성인자는 매우 중요하다^{7, 36)}. 특히 조골세포와 치주인대세포의 이주능력에 대한 작용이 중요한데 그 이유는 치주병소의 기저부에는 항상 골조직과 치주인대가 있으며 완벽한 치주재생이 이루어지기 위해서는 이들 세포가 치관쪽으로 이동하여야 하기 때문이다. 강력한 주성 성분없이 세포들의 치관쪽 이동은 일어나지 않을 것이며 골형성이식재나 이주능력과 함께 증식이 중요한데 병소 기저부의 치주인대세포들이 창상부위로 이주한 후 휴지기에 빠지는 것을 방지하여야 하기 때문이다. 이러한 성장인자 중 PDGF는 골형성과 창상치유에 주로 관계하는 것으로 알려져 있다^{1, 7)}. 또한 PDGF는 골흡수와 교원질 퇴화에도 관여하는데 이는 교원질 분해효소의 생성을 자극하기 때문이다³⁷⁾. PDGF가 조직재생에 미치는 영향의 원리는 상처 발생 직후 최초로 혈소판이 침착되고 혈구가 형성되면 처음 나타나는 세포는 과립세포, 단핵세포와 임파구이며 PDGF는 이때 혈소판 단핵세포와 손상받은 내피세포에 의해 다른 성장인자와 함께 분비된다. 혈소판으로부터 유래된 PDGF에 의해 초기의 백혈구와 섬유아세포를 이주하게 하고 대식세포로부터 유래된 PDGF는 섬유화과정에 주된 역할을 한다. 즉 혈구가 형성될 때 혈소판과 손상받은 내피세포, 그리고 상처속으로 들어가 대식세포로 전환된 단핵세포로부터 유래된 PDGF는 섬유아세포의 이주와 증식 그리고 신생 결합조직의 형성을 야기한다.

이 연구의 목적은 골형성세포로의 분화능력에 대한 표지인자로 알려진 조골세포의 증식도와 염기성 인산 분해효소의 활성도, 석회화결절 형성정도 및 osteocalcin 합성도를 측정하기 위하여 ROS 17/2.8세포와 HOS 세포에서 PDGF-BB를 농도별로 투여하여 결과를 확인하므로서 PDGF가 치주조직재생에 중요한 골세포 분화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 조골세포의 배양

백서와 사람 조골세포주인 ROS 17/2.8 세포와

HOS 세포를 사용하였으며 각각 통상적인 방법에 의해 5% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)과 항생제가 포함된 F12 배양액과 10% FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle media(DMEM, Gibco, USA) 에서 배양하였다. 모든 세포는 75cm²배양 플라스크에서 배양하였으며 배양액은 일주일에 2회 교환하고 세포가 단층을 이룬 후 1 : 10으로 계대배양하였다. 배양시 온도는 37℃, 습도는 95%를 유지하였고 계속하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다. 세포는 실험목적에 따라 24 well plate와 6 well plate에 분주하여 일주일간 배양하여 세포가 단층을 이룬 후 실험에 사용하였다.

2. 세포증식도 측정

조골세포를 24-well plate에 well 당 2×10^4 개의 세포가 되도록 분주하여 배양하면서 세포가 단층을 이루기 전 PDGF-BB를 여러 가지 농도(0.1, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml)로 혹은 시간의 경과에 따라 처리하였으며, 배양이 끝난 후에는 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 부착된 세포를 모아 인산 완충 생리식염수(D-PBS, pH 7, Gibco, USA)로 희석시킨 후 광학현미경(Nikon, Japan)하에서 hemocytometer(Sigma, USA)를 이용하여 계수 하였다. 계수한 세포는 대조군에 비해 %로 표시하였다.

3. 조골세포의 염기성 인산 분해효소 활성도 측정

세포내의 염기성 인산 분해효소 활성도를 측정하기 위해 24-well plate에서 10 ng/ml의 PDGF-BB를 처리하여 시간별(1, 2, 3일)로 배양하여 계수한 후 원심 분리하여 세포를 모은 후 증류수를 첨가하여 ultrasonic disrupter(Tomy, Seiko, Tokyo, Japan)로 10초간 초음파처리 하여 세포추출액을 효소활성에 사용하였다.

세포추출액의 일정량을 0.1% Triton X-100/saline으로 상온에서 처리하고 기질인 20 mM의 *p*-nitrophenyl phosphate(PNPP, Sigma, USA) 존재하에

glycine-NaOH buffer(pH 10.4)와 함께 37℃에서 30분간 반응시켜 기질인 PNPP로부터 유리되어 나온 PNP의 양을 흡광광도계(spectrophotometer, Shimadzu, Japan)를 이용하여 405 nm에서 비색정량하였다.

4. 조골세포의 석회화결절 형성 측정

조골세포를 24-well plate에 분주하여 세포가 단층으로 증식한 후 매 2-3일마다 50μg/ml ascorbic acid(Sigma, USA)와 10 mM β-glycerophosphate(Sigma, USA)를 혼합한 신선한 배양액으로 교환하며 여러 가지 농도(0.1, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml)의 PDGF-BB를 처리하였다. 처리를 시작한 19일 후 3.7% formalin으로 세포를 고정하고 3% silver nitrate(Sigma, USA)용액을 넣어 직사광선에서 석회화결절형성이 보일 때까지 15-30분간 반응시킨 후 1% toluidine blue(Sigma, USA)로 대조염색을 시행하였다. 염색이 완료된 후 광학현미경(Nikon, Japan)하에서 석회화결절의 형성을 관찰하였다.

5. Osteocalcin 생성 측정

Osteocalcin 합성을 ROS 17/2.8와 HOS 세포에서 측정하였다. 6-well plate에서 세포가 단층을 이룬 후 72 시간동안 PDGF-BB를 처리한 후 0.5% Triton X-100/PBS를 이용하여 세포추출액을 준비하였다.

세포추출액은 enzyme immunoassay(EIA) kit(Takara, Biomedicals, JAPAN)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 osteocalcin 합성량을 측정하였다. 즉, 각 농도의 osteocalcin 표준용액과 세포추출액을 각 well에 첨가한 후 상온에서 2시간 반응시킨 후 반응액을 버리고 인산 완충 생리식염수로 3회 세척하였으며 Antibody-POD 결합용액을 첨가하여, 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응액을 버리고 PBS로 다시 4회 세척한 후 기질용액을 첨가하여, 상온에서 15분간 반응시켰다. 1N 황산을 각 well에 더해서 반응을 정지시킨 다음 증류수를 이용하여 대조군을 삼은 후 파장 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 발색은 반응

정지 후 1시간까지 안정하며 그래프용지의 가로축에 각 osteocalcin 표준용액의 농도를, 세로축에 대응할 흡광도를 놓아 표준곡선을 작성하고, 세포추출액의 흡광도로부터 대응하는 osteocalcin 농도를 읽었다.

6. 통계처리

실험결과는 평균과 표준 오차로 나타내었으며 Student's *t* test를 이용하여 통계적으로 분석하였다.

III. 실험결과

1. 조골세포의 세포증식도 측정

ROS 17/2.8 세포와 HOS 세포의 세포증식도를 측정하기 위하여 여러 가지 농도(0.1, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml)의 PDGF-BB를 처리한 결과 ROS 17/2.8 세포는 유의차를 보이지 않은 반면 HOS 세포의 경우 모든 농도(0.1, 0.4, 2, 10, 50ng/ml)에서 세포증식이 증가되었고 그 증가는 농도 의존적으로 나타났으며 특히 10ng/ml의 농도에서 현저한 증가를 나타내었다 (Table 1과 Figure 1 및 2).

또한 시간경과에 따른 세포증식도를 측정하기 위하여 10 ng/ml의 PDGF-BB를 처리하여 처리 전 및

Table 1. Effect of PDGF-BB on cell proliferation in ROS 17/2.8 and HOS cell culture

| PDGF conc. (ng/ml) | Cell proliferation(% of control) | |
|-----------------------|----------------------------------|----------------|
| | Ros 17/2.8 | HOS |
| 0 | 100±6.11 | 100±7.00 |
| 0.1 | 123.96±7.93* | 122.76±5.97** |
| 0.4 | 89.41±8.41 | 135.07±10.17** |
| 2 | 85.25±7.03 | 174.25±10.26** |
| 10 | 115.21±10.37 | 182.84±9.89** |
| 50 | 124.88±8.29* | 118.66±7.46** |

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ from Student's *t* test

처리 후 1, 2, 3일째 세포증식도를 측정한 결과 대조군과 PDGF-BB 처리군 모두 시간이 경과함에 따라 세포증식이 증가하였으며 두 세포 모두 3일째 대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다(Figure 3 및 4).

2. 조골세포의 염기성 인산 분해효소 활성도 검사

ROS 17/2.8 세포와 HOS 세포의 염기성 인산 분해 효소 활성도를 측정한 결과, ROS 17/2.8 세포에서는 PDGF-BB 농도가 0.1ng/ml, 0.4ng/ml, 2ng/ml 일때

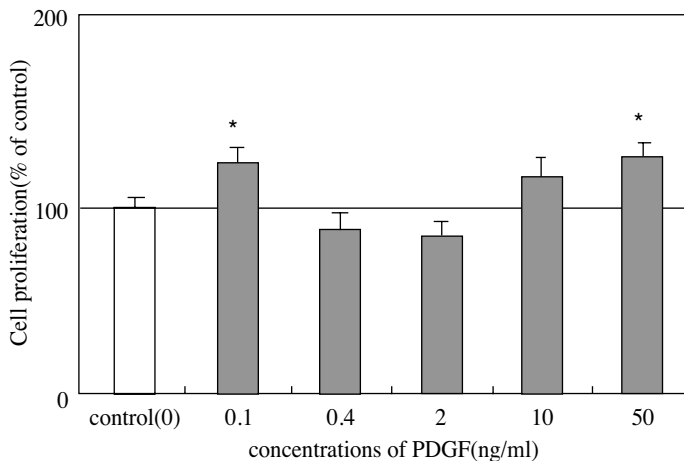


Figure 1. Effect of PDGF-BB on cell proliferation as determined by cell counting. Ros 17/2.8 cells counting. Ros were cultured for 48 hours in the DMEM/10% FBS with increasing concentrations of PDGF. (*: $p < 0.05$ from Student's *t* test)

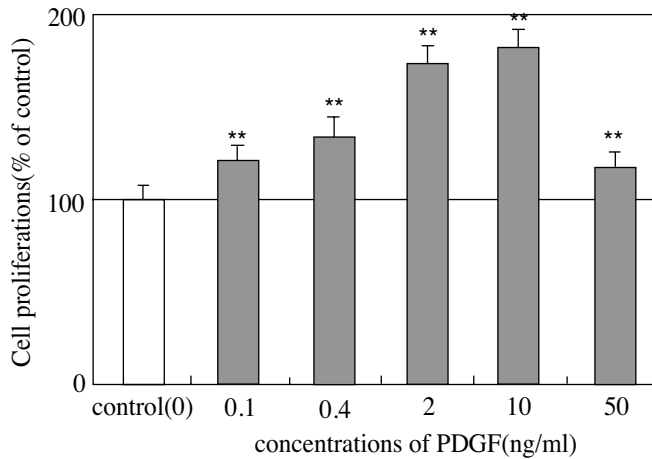


Figure 2. Effect of PDGF-BB on cell proliferation as determined by cell counting. HOS cells were cultured for 48 hours in the DMEM/10% FBS with increasing concentrations of PDGF, (**:p < 0.05 from Student's t test)

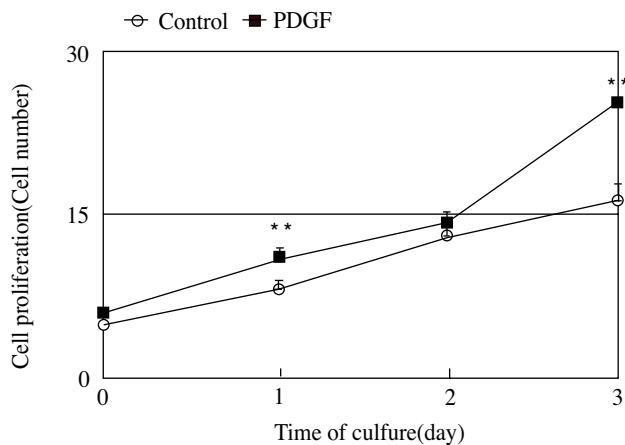


Figure 3. Time course effect of PDGF-BB on cell proliferation. ROS 17/28 cells were cultured with 10ng/ml PDGF, (**:p < 0.01 from Student's t test)

활성도가 증가하였고, 10ng/ml, 50ng/ml 일 때 감소하였다. HOS 세포에서는 PDGF-BB 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 특히 HOS 세포의 경우 10 ng/ml의 PDGF-BB를 처리한 경우 가장 큰 감소를 보였다(Table 2와 Figure 5 및 6).

또한 시간경과에 따른 염기성 인산 분해효소의 활성도를 측정하기 위하여 10 ng/ml의 PDGF-BB를 처리하여 처리 전 및 처리 후 1, 2, 3일째 활성도를 측정

한 결과 ROS 17/2.8 세포의 경우 1일과 3일째 대조군에 비해 활성도가 감소하였으며 HOS 세포의 경우 처리 후 1, 2, 3 일 모두 대조군에 비해 활성도가 감소하는 경향을 나타내었다(Figure 7 및 8).

3. 조골세포의 장기배양시 석회화결절 형성 측정

HOS 세포를 19일간 배양하여 von Kossa 염색 후

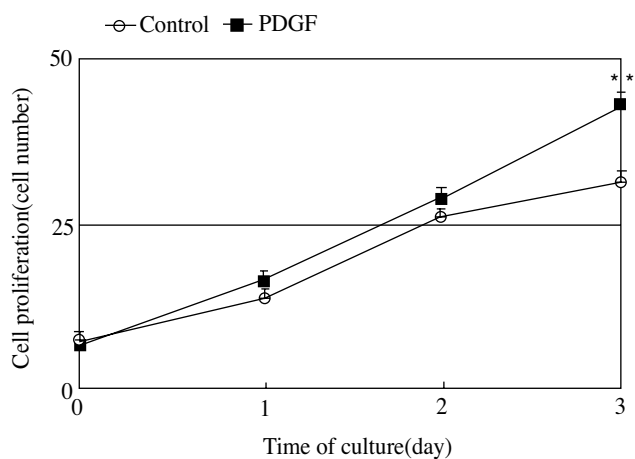


Figure 4. Time course effect of PDGF-BB on cell proliferation, HOS cells were cultured with 10ng/ml PDGF. (**: $p < 0.01$ from Student's *t* test)

Table 2. Effect of PDGF-BB on ALP activity in ROS 17/2,8 and HOS cell culture

| PDGF concn, (ng/ml) | ALP activity per cell number | |
|------------------------|------------------------------|------|
| | ROS 17/2,8 | HOS |
| 0 | 8,78 | 6,72 |
| 0,1 | 9,00 | 4,18 |
| 0,4 | 10,46 | 4,14 |
| 2 | 9,42 | 3,97 |
| 10 | 8,04 | 3,16 |
| 50 | 7,79 | 4,40 |

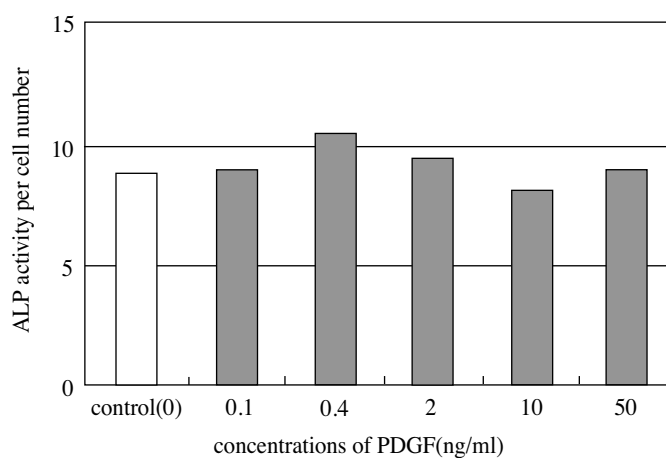


Figure 5. Effect of PDGF-BB on ALP activity, ROS 17/2,8 cells were cultured for 48 hours with increasing concentrations of PDGF.

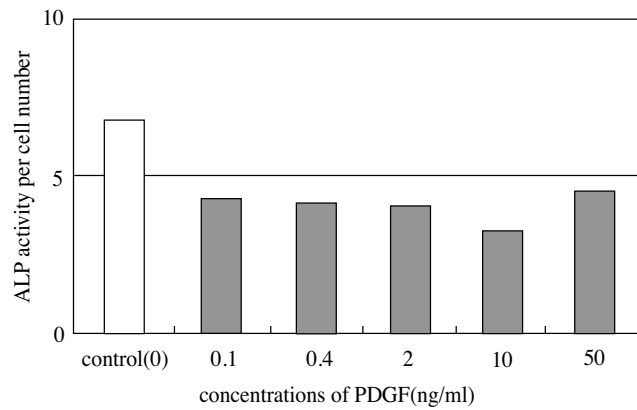


Figure 6. Effect of PDGF-BB on ALP activity, HOS cell were cultured for 48 hours with increasing concentrations of PDGF.

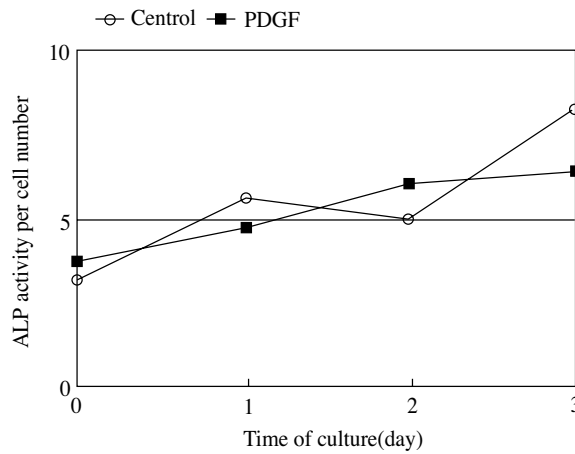


Figure 7. Time corese effect of PDGF-BB on ALP activity, ROS 17/2,8 cells were cultured with 10ng/ml PDGF

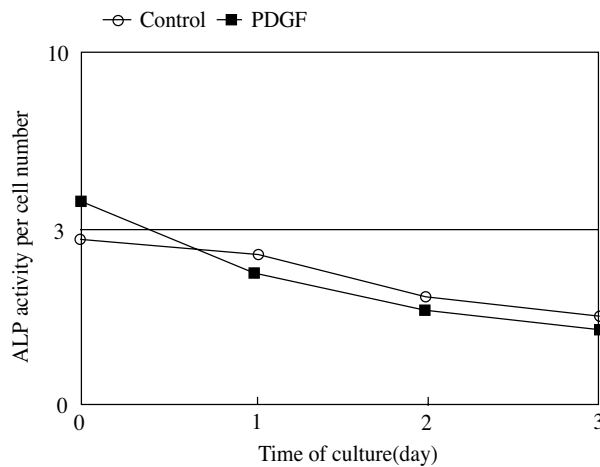


Figure 8. Time course effect of PDGF-BB on ALP activity, HOS cells were cultured with 10ng/ml PDGF

광학현미경으로 관찰한 결과 대조군에서 다수의 작은 석회화결절을 관찰한 결과, HOS 세포에서는 0.1ng/ml, 0.4ng/ml의 PDGF-BB를 처리한 결과 대조군과 별 차이 없이 다수의 작은 석회화결절이 관찰되었고, 10ng/ml와 50ng/ml의 PDGF-BB 처리 결과 석회화결절의 크기는 증가하였으며, 그 수는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다(Table 3과 Figure 9).

Table 3. Effect of PDGF-BB on the calcified nodule formation in HOS cells in culture

| PDGF conc.(ng/ml) | No. of calcified nodule |
|-------------------|-------------------------|
| 0 | 71.00±27.78 |
| 0.1 | 69.50±8.45 |
| 0.4 | 71.50±12.92 |
| 2 | 58.25±10.38 |
| 10 | 51.50±9.49 |
| 50 | 38.50±8.43 |

Data represent Mean±S.E of 4 replicates.

4. 조골세포의 osteocalcin 합성량 측정

Osteocalcin 합성량을 측정한 결과, 두 세포 모두

에서 PDGF-BB 처리시 농도가 증가함에 따라 osteocalcin 합성량이 억제되었으며, HOS세포에는 ROS

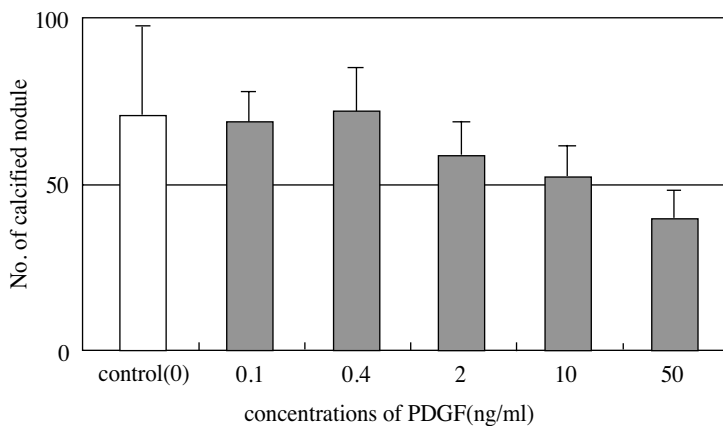


Figure 9. Effect of PDGF-BB on the calcified nodule formation in HOS cells in cultures

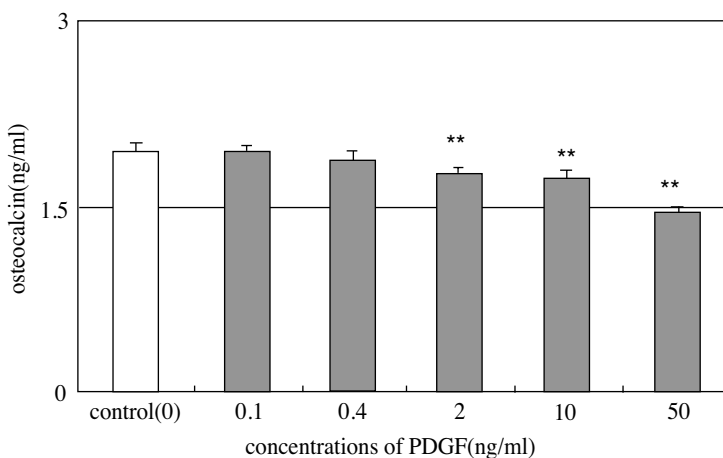


Figure 10. Effect of PDGF-BB on the osteocalcin production in ROS 17/28 cells in culture(**:P<0.01 form Student' s t test)

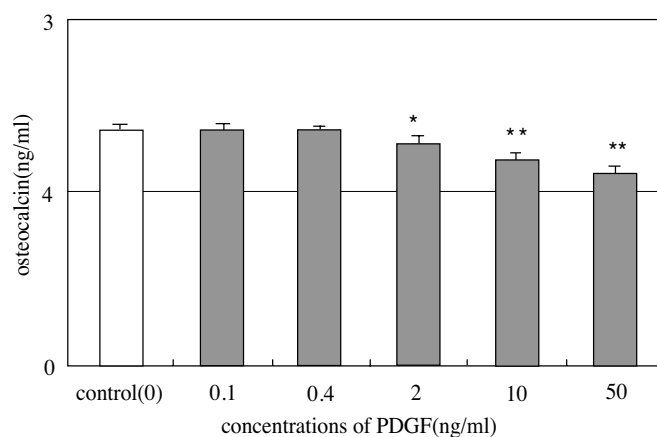


Figure 11. Effect of PDGF-BB on the osteocalcin production in HOS cells in cultures(*:p <0,05, **:p <0,01 from Student's *t* test)

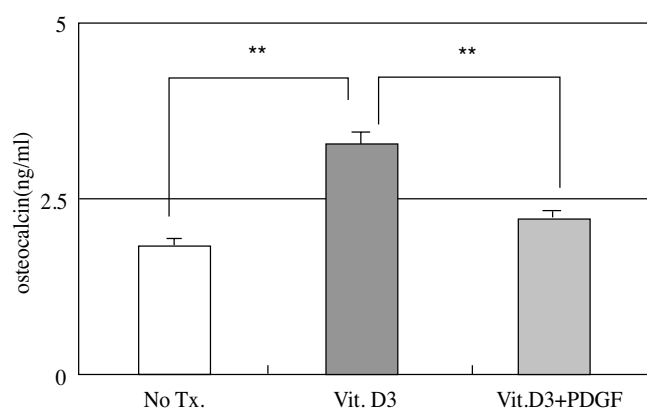


Figure 12. Effect of PDGF-BB on the 1,25(OH)₂D₃-stimulated osteocalcin production in cultures of ROS 17/2.8 cells in cultures(**:p <0,01 from Student's *t* test)

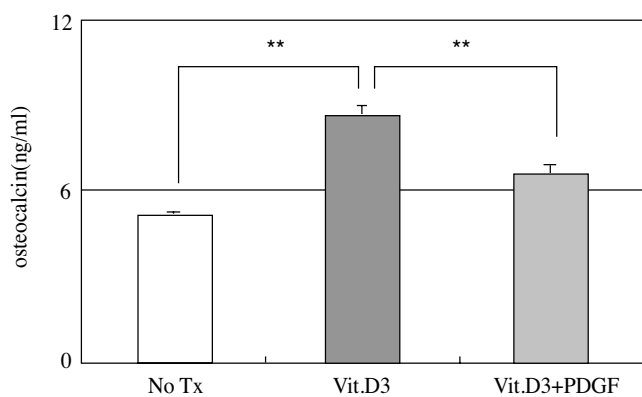


Figure 13. Effect of PDGF-BB on the 1,25(OH)₂D₃-stimulated osteocalcin production in cultures of HOS cells in cultures(**:p <0,01 from Student's *t* test)

17/2.8세포에 비하여 osteocalcin 합성량이 상대적으로 높게 나타났다(Figure 10 및 11). 또한 1,25(OH)₂D₃를 처리한 결과 osteocalcin 합성량이 대조군에 비하여 증가되었으며, 1,25(OH)₂D₃와 PDGF-BB를 같이 처리한 결과, 1,25(OH)₂D₃에 의하여 증가된 osteocalcin 합성량도 억제하였다(Figure 12 및 13).

IV. 총괄 및 고안

골조직은 교원질, 당단백과 같은 세포의 기질과 조골세포, 파골세포, 골세포 등 여러 종류의 세포들로 구성되어있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서 지속적으로 골개조가 일어나며, 골개조는 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포의 골형성에 의하여 균형을 이루는 과정으로 순차적으로 진행된다. 이 중 골기질의 성분을 주로 합성하는 조골세포는 미분화 간엽세포에서 유래된 전조골세포가 골표면에 도달하여 성숙한 조골세포로 분화되고, 10-20%가 골세포로 석회화조직에 묻힌다고 알려져 왔다³⁸⁾.

골대사과정은 동일 조직내에서 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포에 의한 골형성이 상호 보완적 혹은 상호 견제적인 현상으로 동시에 발견되는 결합현상이라 할 수 있다. 이러한 골흡수와 형성의 균형정도를 평가하는데 과거에는 골교체율이 이용되었으나 최근에는 생화학적 표지자를 이용하게 되었다. 즉 골형성의 생화학적 표지자로서는 osteocalcin (Bone gla-protein), procollagen I carboxyl terminal extension peptide 등이 사용되고 염기성 인산 분해 효소 활성도도 많이 사용된다. 조골세포의 활성도를 연구하기 위하여 여러 가지 방법들이 기술되었는데 이에는 골조직배양, 골유도세포 혹은 조골세포 유사 세포 일차배양 등이 포함되며, 이러한 배양 방법은 조골세포의 병리와 생리를 이해하는데 중요한 공헌을 하였고, 최근에는 사람의 조골세포 배양방법도 여러 연구가들에 의하여 발전되었다³⁹⁾.

치주조직은 치은, 치주인대, 백악질 그리고 치조골 등 네 가지 조직학적으로 상이한 조직이 상호 연결된 복합구조로 구성되어있다. 또한 치주조직 자체는

두 개의 경조직인 치근표면의 백악질과 치조골사이의 교원섬유를 지닌 연조직이 존재하여 치아를 고유 위치에 상존하게 하여 상호연결하는 형태의 구조를 가진 특수한 형태를 지니고 있다. 이러한 구조는 치태침착으로 인해 조직파괴가 야기되어 고유기능을 상실하는 것이 치주질환이며, 소실된 치주조직을 재생한다는 의미는 치아를 고유위치에 잔존시켜 저작기능을 완성하게 하는 것이다. 치주치료의 궁극적인 목적은 파괴된 치주조직 결손부에 신생골과 신생백악질 형성 그리고 그 사이에 기능적으로 배열된 치주인대가 형성되는 치주조직의 재생이다. 과거 여러 치료 방법은 대부분 긴접합상피결합^{40, 41)}, 치근흡수^{42, 43)}, 골유착^{44, 45)} 등의 결과를 초래하여 치주조직재생이라는 원래의 목적을 이룰 수 없었다. 그러나 최근에 치주조직에 관여하는 여러 조직에 대한 성질과 또한 이들 각종세포의 고유성상이 규명되고 세포의 화학구조가 밝혀지면서 이들 치유에 관여하는 세포의 생성 및 활성을 조절하려는 노력이 시행되어져 왔다⁴⁶⁾. 본 연구에서 PDGF-BB를 실험재료로 정한 배경은 골유래세포 배양시 PDGF-BB를 첨가한 경우 세포의 증식률이 촉진되었다는 Piche와 Graves²²⁾의 연구와 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF-BB의 효과를 규명한 Rutherford 등¹⁹⁾의 보고에 근거를 두었다. 또한 Lynch 등²⁴⁾은 생체실험에서 PDGF-BB나 IGF-I을 단독으로 치주결손부에 적용하였을 때 신생치조골과 신생백악질의 형성을 자극할 수 있다는 보고를 하였고, 두 성장인자를 혼용할 때 그 효과가 상승된다고 보고하였다.

PDGF는 Ross⁵⁾와 Kohler와 Lipton³²⁾에 의하여 동맥의 평활근 세포의 증식을 자극하는 물질이 혈소판에서 분비된다는 사실이 발견되었고, Antoniades 등⁷⁾이 이를 분리 정제하여 PDGF라 명명하였다. 그러나 이름과는 달리 혈소판 뿐 아니라 최근에는 단핵세포, 대식세포⁴⁷⁾, 섬유아세포⁴⁸⁾, 내피세포⁴⁹⁾ 및 골기질⁵⁰⁾ 등에서도 발견된다고 보고되고 있다. PDGF는 열에 안정적인 단백질로 AA, BB, AB 세 가지 형태가 있으며 각각은 세포막의 α , β 수용기에 선택적으로 결합하며 그 기능은 DNA와 교원질 합성, 섬유아세

포, 평활근세포에 대한 화학주성 및 유사분열 촉진 등으로 밝혀지고 있다. PDGF의 치주조직 재생에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으나 그 적용법에 대하여는 아직 규명되지 않거나 정해진 바가 없어 학자에 따라 다양하게 연구되고 있다.

PDGF의 골조직에 대한 영향은 여러 연구에서 다소 상반된 견해를 보이고 있어 본 연구에서는 PDGF가 조골세포의 분화에 미치는 영향을 알아보고자 실험을 시행하였다. ROS 17/2.8 세포와 HOS 세포는 백서와 사람의 골조직에서 분리된 조골세포로서 섬유아세포 형태를 보이다가 장기간 배양시 높은 농도의 염기성 인산 분해효소 활성도를 보이며 조골세포와 골세포로 분화 가능하며 골기질의 석회화를 유도하는 세포로 알려져 있다.

ROS 17/2.8세포와 HOS세포에 대한 PDGF-BB의 영향을 관찰하기 위하여 농도별, 시간경과에 따른 조골세포의 증식도를 측정해 본 결과 ROS 17/2.8세포에서는 세포증식도에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 HOS세포에서는 PDGF-BB 모든 농도(0.1, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml)에서 대조군에 비하여 세포증식도가 증가되었고, 특히 10 ng/ml의 PDGF-BB 농도에서 현저한 증가를 나타냈다. 이러한 결과는 PDGF-BB의 적용농도에 따른 세포증식에 관한 여러 시험관적인 연구 결과와 일치하는 내용이다.

Canalis⁵¹⁾는 쥐의 두개골을 조직배양하여 0.1, 10, 100 ng/ml의 PDGF-BB투여시 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가함을 보고하였고, Oates 등²¹⁾은 사람의 치주인대세포에 0.1, 0.5, 10, 20, 50 ng/ml의 PDGF-BB, AA를 투여해본 결과 농도가 증가함에 따라 양군 모두 DNA 합성능이 증가하였다고 보고하였다. 정 등⁵²⁾은 치주인대세포에 PDGF-BB투여시 세포증식을 촉진시키며, 20 ng/ml농도시 최고의 효과를 보인다고 보고하였다. Blom 등⁵³⁾은 PDGF가 농도의존적으로 세포의 활성을 증가시키며, 50 ng/ml농도에서 DNA 합성이 274%로 나타나고 최적의 유사분열 유발농도는 0.1-15 ng/ml 라고 보고하였으며, 생체에서 세포이주와 증식에 적절한 PDGF의 농도에 대하여는 아직 알려진 것은 없으나 여러 선행의 연구를 참조시 주로 50 ng/ml이상의 PDGF농도에서

세포의 활성화에 큰 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 그러나 이 연구에서는 PDGF-BB의 농도가 10 ng/ml일 때가 50 ng/ml일 때보다 세포의 증식도가 증감을 보였다. 이는 정 등⁵²⁾은 20 ng/ml일 때, Blom 등⁵³⁾은 50 ng/ml일 때 가장 증식도가 크다는 결과와는 다른 것이다. 이 연구에서 PDGF-BB농도를 분류시 순차적으로 희석하는 방법을 사용하여 50, 10, 2, 0.4, 0.1 ng/ml의 농도로 배분되어서 20 ng/ml의 농도로는 실험을 하지 못했다. 다음의 실험에서는 10 ng/ml와 50 ng/ml 사이의 농도를 세분하여 가장 증식도가 높은 농도를 정확히 찾아 보고해야 될 것으로 생각된다.

PDGF-BB 처리 후 시간경과에 따른 세포증식도 관찰 결과 ROS 17/2.8세포와 HOS세포 모두에서 시간이 경과함에 따라 세포증식이 증가함이 보였는데 특히 3일째 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 보였다. PDGF-BB 적용후 시간경과후 이곳에 세포의 이주와 증식이 촉진되어 치주인대 섬유아세포의 급속한 재군집과 새로운 치주인대 형성에 기여한다는 보고와 일치하고 있다¹⁹⁻²¹⁾. PDGF-BB의 임상적 적용시 유용한 시간으로 사용될 수 있는 시간은 30초, 1, 2, 4 및 8분 등 비교적 짧은 시간이 이용될 수 있다. 그러나 이번 실험에서는 PDGF-BB적용후 1, 2, 3일에 세포증식도를 측정한 것이어서 임상적으로 적용이 불가능한 시간이다. 1, 2, 3일후 세포증식도의 증가함을 밝히는 것보다 임상적으로 적용할 수 있는 적용후 짧은 시간 후에 나타나는 세포증식도를 관찰한 결과가 더 필요할 것으로 생각된다. 주로 세포막에 결합되어 존재하는 염기성 인산 분해효소는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내는 효소이고⁵⁴⁾ 세포외막과 석회화조직의 기질소포에서 높은 농도로 발견되며⁵⁶⁾ 석회화 과정동안 무기인산의 국소적 농도증가⁵⁵⁾, 광화결절 성장억제제의 국소적 파괴⁵⁷⁾, 무기인산의 운반⁵⁸⁾, 세포분열이나 분화의 조절자⁵⁹⁾로써의 역할을 한다. 그러나 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로써 염기성 인산 분해효소의 정확한 기능은 알려져있지 않다.

Robinson 등⁶⁰⁾은 유기인산기질에서 무기인산을 분리해낼 수 있는 효소라고 보고하였고, Siffert⁶¹⁾는

골형성이전의 골기질형성에 주로 관여한다고 보고하였고, Stein 등⁶²⁾은 골세포의 표지인자로 염기성 인산 분해효소 활성도를 측정해 보아야하며 염기성 인산 분해효소 활성도는 골세포분화의 표지인자라고 보고하였다. 이 실험에서 ROS 17/2.8세포와 HOS세포에서 PDGF-BB농도에 따른 염기성 인산 분해효소 활성도를 측정한 결과, ROS 17/2.8세포에서는 저농도(0.1, 0.4, 2 ng/ml)처치시 활성도가 증가하였으나 고농도(10, 50 ng/ml)에서는 감소하였다. HOS세포에서는 모든 농도에서(0.1, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml) 감소하였으며, 특히 10 ng/ml에서 가장 큰 감소를 보였다. 이는 Centrella 등¹³⁻¹⁵⁾이 발표한 태생기 쥐의 골에서 PDGF-AB, BB 적용시 염기성 인산 분해효소 활성도가 감소한다는 보고와 일치한다. 이렇게 감소하는 이유는 PDGF가 골아세포에 작용하여 다른 다양한 성장인자의 효과를 조절하기 때문에 활성도가 감소하는 것으로 사료된다. 그러나 PDGF-BB가 단순히 염기성 인산 분해효소 활성만을 지연시키는 결과인지, 다른 성장인자나 다른 골기질 단백질에 영향을 미친 결과인지에 대하여는 이 실험에서는 알 수 없었다. 10 ng/ml PDGF-BB 처치 후 시간경과에 따른 염기성 인산 분해효소 활성도를 측정한 결과 ROS 17/2.8세포는 전반적인 활성도는 증가하였으나 대조군에 비하여 1, 3일 후에는 감소하였다. HOS세포에서는 염기성 인산 분해효소 활성도가 감소하였고 대조군에 비하여서도 1, 2, 3일 후 모두 다 감소하였다. 이 결과는 서 등⁶³⁾과 Nojima 등⁶⁴⁾의 연구 결과인 치주인대세포의 염기성 인산 분해효소 활성도가 시간이 경과함에 따라 증가한다는 결과와 일치되지 않는 것이다. 그러나 이는 적용세포의 종류, 세포 접종수에 의한 세포의 밀도, 세포배양기간과 실험에 사용된 배양액의 농도 등의 실험방법의 차이에 의한 것으로 생각된다. 그러나 일반적으로 염기성 인산 분해효소의 활성도는 처음 몇 일동안 증가하다가 나중에 감소한다는 결과와 일치하지 않으므로 이에 관한 집중적인 연구가 더욱 필요하다고 생각된다.

여러 농도의(0.1, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml) PDGF-BB를 HOS세포에 처치한 결과 19일후에 다수의 석회화결절이 관찰되었다. 이는 Hiroko 등⁶⁵⁾이 발표한 신생

골 쥐 두개골에 PDGF처치시 21일 후에 석회화결절이 형성되었다는 연구 결과와 일치하는 것이다. 그러나 이번 실험에서 저농도(0.1, 0.4 ng/ml) PDGF-BB 처치시 작은 크기의 석회화결절이 관찰되었고, 고농도의(10, 50ng/ml) PDGF-BB 처치시 크기에 있어서는 저농도의 경우보다는 큰 석회화 결절이 관찰되었으나 숫자에 있어서는 대조군보다 감소하는 결과를 보였다. 이는 최 등⁶⁶⁾이 발표한 시간경과에 따라 석회화 결절의 수와 크기가 증가했다는 보고와는 다른 것이다.

조골세포의 osteocalcin 합성량 측정의 결과는 ROS 17/2.8세포와 HOS세포에 여러 농도의(0.1, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml) PDGF-BB 처치시 농도가 증가함에 따라 osteocalcin 합성량이 억제되었고 HOS세포에서 ROS17/2.8세포 보다 상대적으로 osteocalcin 합성량이 높게 나타났다.

이러한 연구 결과 PDGF-BB는 조골세포의 증식을 촉진시키는 작용을 하는 반면 개개 세포의 기능은 억제시키는 양상을 보인 것으로 판단된다. 따라서 PDGF-BB의 영향은 다른 골기질단백질이나 성장인자에 직접적으로 영향을 끼치거나 PDGF-BB에 영향을 받은 염기성 인산 분해효소가 다른 성장인자나 골기질 단백질에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그러나 골개조와 연관되어 PDGF의 어떤 요소가 염증과 창상치유에 반응하는 기능을 갖고 있을 것으로만 추측하고 있다⁶⁾. 그러므로 다른성장인자와 병용하여 골세포의 분화와 증식에 대한 효과를 확인하기 위하여 여러 농도의 PDGF를 처치하여 더 많은 시험관내 실험과 생체실험을 하여 지속적인 연구를 해야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

PDGF가 배양중인 조골세포의 증식과 활성도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 백서와 사람의 조골세포주인 ROS 17/2.8 세포와 HOS 세포를 배양하였다. 배양 후 세포를 계수하여 세포증식도를 분석하였고, 염기성 인산분해 효소 활성도와 석회화결절 형성 및 osteocalcin 합성도를 측정하여 조골세포의 활

성도를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ROS 17/2.8 세포와 HOS 세포에 PDGF-BB를 처리한 결과, ROS 17/2.8 세포에서는 각 농도간에 세포증식도에서 유의차를 보이지 않은 반면 ($p>0.05$), HOS 세포의 경우 모든 농도에서 세포증식이 증가되었고, 그 증가는 농도 의존적으로 나타났으며, 특히 10 ng/ml의 농도에서 현저한 증가를 나타내었다.
2. 시간경과에 따른 세포증식도를 측정하기 위하여 10 ng/ml의 PDGF-BB를 처리한 결과, 대조군과 PDGF-BB 처리군 모두에서 시간이 경과함에 따라 세포증식도가 증가하였으며, 두 세포 모두 3일째 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다.
3. ROS 17/2.8 세포와 HOS 세포의 염기성 인산분해 효소 활성도를 측정하기 위하여 여러 가지 농도(0.1, 0.4, 2, 10, 50 ng/ml)의 PDGF-BB를 처리한 결과 두 세포 모두 농도가 증가함에 따라 활성도가 감소하는 경향을 나타내었으며 HOS 세포의 경우 특히 10 ng/ml의 PDGF-BB를 처리한 경우에서 가장 큰 감소를 보였다.
4. 시간경과에 따른 염기성 인산 분해효소의 활성도를 측정하기 위하여, 10 ng/ml의 PDGF-BB를 처리한 결과, ROS 17/2.8 세포의 경우 1일과 3일째 대조군에 비해 활성도가 감소하였으며, HOS 세포의 경우에는 처리 후 1, 2, 3 일 모두 대조군에 비해 활성도가 감소하는 경향을 나타내었다.
5. 석회화결절 형성을 관찰한 결과, HOS 세포에서는 0.1 ng/ml, 0.4 ng/ml의 PDGF-BB를 처리한 경우 대조군과 별 차이 없이 다수의 작은 석회화결절이 관찰되었고, 10 ng/ml와 50 ng/ml의 PDGF를 처리한 경우에는 석회화결절의 크기는 증가한 반면 그 수는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다.
6. Osteocalcin 합성량을 측정한 결과, 두 세포 모두에서 PDGF-BB 처리시 농도가 증가함에 따라 osteocalcin 합성량이 억제되었으며, HOS 세포에는 ROS 17/2.5세포에 비하여 osteocalcin

합성량이 상대적으로 높게 나타났다. 또한 1,25(OH)₂D₃를 처리한 결과 osteocalcin 합성량이 대조군에 비하여 증가되었으며, 1,25(OH)₂D₃와 PDGF-BB를 같이 처리한 경우에는 1,25(OH)₂D₃처치에 의하여 증가된 osteocalcin 합성량이 억제됨이 관찰되었다.

이상과 같은 결과를 종합하여 볼 때 PDGF-BB는 조골세포의 증식을 촉진시키는 작용을 하는 반면 개개 세포의 기능은 억제시키는 양상을 보인 것으로 사료된다

VI. 참고문헌

1. Canalis, E., McCarthy, T.L. and Centrella, M. : The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol. Meta. Cl : North Am.* 18 : 903, 1989.
2. Terranova, V.P., Goldman, H.M. and Listgarten, M.A. : The periodontal attachment apparatus. edited by Genco, R.J., Goldman, H.M. and Cohen, D.W. *Contemporary periodontics*. The CV Mosby. Co. St. Louis, pp 33-54, 1990.
3. Antoniadis, H.N. : Human platelet-derived growth factor(PDGF) : Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 7314-7317, 1981.
4. Deuel, T.F., Huang, J.S., Proffit, R.I., Baenzinger, J.U., Chang, D. and Kennedy, B.B. : Human platelet-derived growth factor purification and resolution into two active protein fractions. *J. Biol. Chem.* 256 : 8896-8899, 1981.
5. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L. : A platelet-derived serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 : 1207-1210, 1974.
6. Kohler, N and Lipton, A : Platelets as a source of

- fibroblast growth promoting activity. *Exp. Cell Res.* 87 : 297-301, 1974.
7. Antoniades, H.N., Scher, C.D. and Stiles, C.D. : Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 1809-1813, 1979.
 8. Hammacher, A., Hellman, U. and Johnsson, A. : A major part of PDGF purified from human platelet is a heterodimer of one A and one B chain. *J. Biol. Chem.* 263 : 16493-16498, 1988.
 9. Hawiger, J. : Platelet secretory pathway : An overview, *Method, Enzyme*, 169 : 191-195, 1989.
 10. Antoniades, H.N. and Williams, L. T. : Human platelet-derived growth factor: structure and function. *Fed. Proc.*, 42: 2630-2634, 1983.
 11. Deuel, T. F. and Senior, R. M., Huang, J. S. and Griffin, G. L.; Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J. Clin. Invest.* 69 : 1046-1049, 1982.
 12. Senior, R.M., Griffi, G.L., Hwang, J.S., Walz, D.A. and Deuel, T.F. : Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts. *J. Cell Biol.* 96 : 382-385, 1983.
 13. Bauer, E.A., Cooper, T.W., Hwang, J.S., Altman, J. and Deuel, T.F. : Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 4132-4136, 1985.
 14. Tzeng, D.Y., Deuel, T.F., Hwang, J.S. and Baehner, R.L. : Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocytic activation. *Blood* 66 : 179-183, 1985.
 15. Cochran, D.L., Rouse, C.A. Lynch, S.E. and Grave, D.T. : Effects of platelet-derived growth factor isoforms on calcium release from neonatal mouse calvariae. *Bone* 14 : 53-58, 1993.
 16. Centrella, M., McCarthy, T.L. and Canalis, E. : Platelet-derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat parietal bone. *Endocrinology*, 125 : 13, 1989.
 17. Lynch, S.E., Nixon, J.C., Colvin, R.V. and Antoniades, H.N. : The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. *J. Bone Miner. Res.* 11 : 238-247, 1996.
 18. Lynch, S.E., Nixon, J.C., Colvin, R.V. and Antoniades, H.N. : Role of platelet-derived growth factor in wound healing : Synergistic effects with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 7696-7700, 1987.
 19. Rutherford, R.B., Trilsmith, M.D., Ryan, H.E. and Charette, M.F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factors mitogenesis in vitro. *Arch. Oral Biol.* 37 : 139-145, 1992.
 20. Matsuda, N., Lin, W.L., Kumar, N.M., Cho, M.I. and Genco, R.J. : Mitogenic chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J. Periodontol.* 63 : 515-525, 1992.
 21. Oates, T.W., Rouse, C.A. and Cochra, D.L. : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J. Periodontol.* 64 : 142-148, 1993.
 22. Piche, J.E. and Graves, D.T. : Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells : A comparison with human fibroblasts. *Bone*, 10 : 131-138, 1989.
 23. Giannobile, W.V., Finkelman, R.D. and Lynch, S.E. : Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy : Results following a single administration of PDGF/IGF-1. *J. Periodontol.* 65 : 1158-1168, 1994.
 24. Lynch, S.E., Colvin, R.V. and Antoniades, H.N. : Growth factors in wound healing : Single and synergistic effects on the partial thickness porcine skin wounds. *J. Clin. Invest.* 84 : 640-

- 646, 1989.
25. Graves, D.T., Owen, A.J., Barth, R.K., Tempst, P., Winoto, A., Fors, L., Hood, L.E. and Antoniades, H.N. : Detection of c-sis transcripts and synthesis of PDGF-like proteins by human osteosarcoma cells. *Science*, 226 : 972-974, 1984.
 26. Tashjian, A.H., Jr. Hohman, E.L., Antoniades, H.N. and Levine, L. : Platelet- derived growth factor stimulates bone resorption via a prostaglandin mediated mechanism. *Endocrinology* 111:118-124, 1982.
 27. Martin, J.H. and Matthews, J.L. : Mitochondrial granules in chondrocytes, osteoblasts and osteocytes. An ultrastructural and microincineration study. *Clin. Orthop.* 68:273-278, 1970.
 28. Nilsen, R. : Microfilaments in cells associated with induced heterotopic bone formation in guinea pigs. An immunofluorescence and ultrastructural study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., [A]* 88:129-134, 1980.
 29. Stanka, P. : Occurrence of cell junctions and microfilaments in osteoblasts. *Cell Tissue Res.* 159:413-422, 1975.
 30. Scott, B.L. and Glimcher, M.J. : Distribution of glycogen in osteoblasts of the fetal rat. *J. Ultrastr. Res.* 36:565-586, 1971.
 31. Thyberg, S., Nilsson, S. and Friberg, U. : Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on the guinea pig metaphysis with special reference to the lysosomal system of different cell types. *Cell Tissue Res.* 156:273-299, 1975.
 32. Leblond, D.P. : Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue bone and dentin. *Anat. Res.* 224:123-128, 1989.
 33. Butler, W.T. : The nature and significance of osteopontin. *Connec. Tissue Res.* 23:123-136, 1989.
 34. Sodek, J., Chen, J.K., Kasugai, S., Nagata, T., Zhang, Q., McKee, M.D. and Nanci, A. : Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation. In *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, edi. by Slavkin, H. and Price, P., pp 297-306, Excerpta Medica, Amsterdam, 1992.
 35. Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E.C. and Gundberg, C.M. : Osteocalcin and matrix gla protein : Vitamin K-dependent proteins in bone *Physiol. Rev.* 69:990-1046, 1989.
 36. Terranova, V.P., Odziemiec, C., Tweden, K.S. and Spadone, D.P. : Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. *J. Periodontol.* 60 : 293, 1989.
 37. Ross, R., Raines, E.W. and Bowen-Pope, D.F. : The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46 : 155-169, 1986.
 38. Zheng, M.H. : What's new in the role of cytokines on the osteoblast proliferation and differentiation. *Path. Res. Pract.* 188 : 1104-1121, 1992.
 39. Aufmkolk, B., Huashcka, P.V. and Schwartz, E.R. : Characterization of human bone cell in culture. *Calcif. Tissue Int.* 37 : 228-235, 1985.
 40. Polson, A.M. : The root surface and regeneration : Present therapeutic limitations and future biologic potentials. *J. Clin. Periodont.* 13 : 995-996, 1986.
 41. Stahh, S.S. : Repair potential of the soft tissue root interface. *J. Periodontol.* 48 : 545-552, 1977.
 42. Karring, T., Nymann, S., Lindhe, J. and Sirirat, M. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into bone tissue. *J. Clin. Periodont.* 7 : 96-105, 1980.
 43. Nyman, S., Karing, T., Lindhe, J. and Platen, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodont.* 7 : 394-401, 1980.
 44. Andreasen, J.O. : Periodontal healing after replantation and autotransplantation of perma-

- nent incisors. *Int. J. Oral Surg.* 60 : 54-61, 1981
45. Karring, T., Nymann, S., Lindhe, J. and Sirirat, M. : Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *J. Clin. Periodont.* 11 : 41-52, 1984.
 46. Terranova, V.P. and Wikesj, U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of periodontium *J. Periodontol.* 58 : 371-380, 1987.
 47. Rappolee, D.A., Mark, D. and Banda, M.J. : Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vitro : Analysis of mRNA phenotyping, *Science*, 241 : 707-712, 1988.
 48. Antoniadis, H.N., Galanopoulos, T. and Neville-Golden, T. : Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor(PDGF) and PDGF receptor in RNA in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 565-569, 1991.
 49. Sitarus, N.M., Sariban, E. and Pantagis, P. : Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor(PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen. *J. Cell Physiol.* 132 : 376-380, 1987.
 50. Hauschka, P.V., Mavrakos, A.E., Iafrafi, M.D., Doleman, S.E. and Klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J. Biol. Chem.* 261:12665 -12674, 1986.
 51. Canalis, E. : Effect of PDGF on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 30 : 970-975, 1981.
 52. 정성민, 이만섭, 권영혁 조종만 : 혈소판유래성장 인자가 치주인대의 증식에 미치는 효과에 관한 연구. *대한치주학회지*. 22 : 317-330, 1992.
 53. Blom, S., Holmstrup, P., and Dabelsteen, E. : A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast like cells DNA synthesis and morphology. *J. Periodontol.* 65 : 373-378, 1994.
 54. Fernley, H.N. : Mammalian alkaline phosphatases, in *The Enzymes*, vol. 4, edited by Boyer, P.D., Academic Press, New York, pp 417-447, 1971.
 55. Majeska, R.J. and Wuthier, R.E. : Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 391:51-60, 1975.
 56. Anderson, H.C. : Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.* 35:81-101, 1967.
 57. Newman, W.F., DiStefano, V. and Mulryan, B.J. : The surface chemistry of bone : III. Observations on the role of phosphatase. *J. Biol. Chem.* 193:227-235, 1951.
 58. Lowendorf, H.S., Bazinet, G.F. and Slayman, C.W. : Phosphate transport in *Neurospora*. Derepression of a high-affinity transport system during phosphorus starvation. *Biochim. Biophys. Acta.* 389:541-549, 1975.
 59. Farley, J.R., Puzas, J.E. and Baylink, D.J. : Effect of skeletal alkaline phosphatase inhibitors on bone cell proliferation in vitro. *Mineral Electrolyte Metab.* 7:316-323, 1982.
 60. Robison, R. : The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 17 : 286-293, 1923.
 61. Siffert, R.S. : The role of AlPase in osteogenesis. *J. Exp. Med.* 93 : 415-425, 1951.
 62. Stein, G.S., Lian, J.B. and Owen, T.A. : Relationship of tissue specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* 4 : 82-94, 1990.
 63. 서조영, 최재용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교. *대한구강생물학회지*. 15 : 14-27, 1991.

64. Nojima, N., Kobayachi, M., Shionomo, H., Takanashi, N., Sudo, T. and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblast. *J. Periodont. Res.* 25 : 179-185, 1990.
65. Hiroko, S., Arikodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96 : 191-198, 1983.
66. Choi, J.Y., Lee, B.H., Song, K.B., Park, R.W., Kim, I.S., Sohn, K.Y., Jo, J.S., Ryoo, H.M. : Expression patterns of bone related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1

cells, *J. Cell Biochem.* 61 : 609-618, 1996.