

## 구연산과 테트라사이클린으로 처리한 치근면에서 rhBMP-2가 치주인대섬유아세포와 골아세포의 활성화에 미치는 영향

심정민<sup>1</sup> · 한수부<sup>1</sup> · 설영조<sup>1,2</sup> · 이용무<sup>1</sup> · 김경화<sup>1</sup> · 계승범<sup>2</sup> · 최상묵<sup>1</sup> · 정종평<sup>1</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 치과대학 치주과학교실 및 치학연구소

<sup>2</sup>성균관대학교 의과대학 치과학교실

### I. 서론

치주질환으로 인한 치주조직의 상실은 치아발거의 중요한 원인이 되며, 손상이나 결손된 치주조직을 재생시키는 것은 치주치료의 궁극적인 목적이다. 일반적인 치주치료인 기계적 방법으로는 치주조직의 재생없이 긴 점합상피면으로 치유되는 것으로 알려져 있어<sup>1-5)</sup> 보다 효과적인 치주조직의 재생을 도모하기 위하여 자가골, 동종골 및 합성골 혹은 성장인자를 이용하거나 조직유도재생막등의 적용을 시도한 많은 연구들이 진행되어 왔다. 그러나 자가골을 포함한 골이식의 방법은 골유착과 치근흡수 등의 부작용이 보고되고 있고,<sup>6-10)</sup> 조직유도재생술의 방법은 차폐막을 이용하며 상피세포의 근단이동을 저지하므로써 치주인대세포들의 결손부위로 증식 및 분화촉진을 통해 치주조직을 재생시킨다고 보고되어 왔으나<sup>11-14)</sup> 2,3백 골결손부 등에 제한적인 효과만이 확인될 뿐 아직까지는 수평적 골소실을 포함한 보편적인 사용이 제한되고 있으며, 완전한 치주조직의 재생이 보고된 바는 없다.

한편 치주조직재생 관련세포의 증식과 분화를 유도하는 것으로 알려진 PDGF-BB, IGF-1, TGF- $\beta$  등의 성장인자를 이용한 연구들이 활발히 시행되고 있는데<sup>15-19)</sup> 특히 그 중에서 골형성유도단백질(BMP)의 골유도능력을 근거로 BMP를 이용하여 치조골을 포

함한 치주조직을 재생시키려는 노력이 시도되고 있다.<sup>20-26)</sup> Urist가<sup>27)</sup> BMP가 근육 등의 골을 형성하지 않는 조직 이식시에 신생골을 형성하는 것을 처음으로 발견한 후, 탈회골로부터 분리된 단백질추출물이 신생골 유도형성의 원인이 됨을 밝혔다. BMP는 TGF- $\beta$  superfamily의 일종으로 연조직에 매식하면 연골이나 골조직을 형성하는 작용을 하는 단백질의 군을 의미한다. 또한 골아세포계열뿐만 아니라 골을 형성하지 않는 비조골간엽세포군의 조골세포로의 분화를 유도해서 신생골과 백악질의 형성을 촉진하므로써 치주조직재생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 세포배양실험을 통해 rhBMP-2가 미분화 간엽세포들이 조골세포로 분화되게하는 것이 관찰되었고, 개의 하악골에 형성된 골결손부 치유과정에서 rhBMP-2가 구강 악안면부위의 골재생에 폭넓은 치료효과를 가지고 있음이 보고되었다<sup>20)</sup>. 또한 Sigurdsson 등<sup>28)</sup>은 rhBMP-2를 이용해서 수평골 손실부의 골조직을 원래 골높이까지 재생했을뿐만 아니라 백악질 같은 다른 치주접착조직의 재생에도 성공하였으며, Ripamonti<sup>29)</sup>는 BMP-7을 교원질 전달체에 함유시켜서 실험한 결과 샤페르민이 새로 형성된 백악질에 매입되면서 신생백악질이 형성됨을 보고하여 BMP가 골조직 형성에 제한되지 않고 백악질형성이나 치주인대 형성에도 관여한다고 하였다. 이외에도 BMP가 치조제용선 결손부의 증강이나 임플란트주위의 치조골

결손부, 선천적, 외상성 골결손 그리고 상악동하 골결손부위에 성공적으로 사용됨이 보고된 바 있다<sup>30-32)</sup>.

BMP를 도포하기 위한 효과적인 전달체에 관한 연구도 많이 이루어졌는데, 쥐의 하악골에 결손부를 형성한 후 교원질 차폐막과 젤형태의 교원질을 각각 전달체로 이용하여 rhBMP-2를 적용한 실험에서 rhBMP-2의 보다 지속적인 방출이 가능한 교원질 차폐막의 경우에서 더 많은 신생백악질형성이 관찰되었으며<sup>33)</sup>, 고양이의 견치와 원송이의 구치에 형성된 결손부에서 두 층의 교원질 차폐막을 사용한 경우 한 층만 사용한 경우에 비해 좋은 결과를 얻은 바 있다<sup>34)</sup>. 이와같이 골유도물질이 골조직을 형성하고 치주조직재생에 효과가 있는 것은 여러 연구에서 확인된 바 있으나 현재까지는 BMP를 도포할 때의 최적 조건과 BMP도포시 적정 농도 등에 관한 많은 문제점이 해결되지 않고 있다.

한편 황산 및 염산에 의한 치근면 탈회로 치주염 치료에 효과가 있다고 보고된 이래 산이나 효소등을 국소적으로 적용해 보려는 시도들이 있어왔다<sup>35)</sup>. 치주질환에 이환된 치근면에 세포의 부착과 섬유형성이 잘 되지 않는 원인으로는 교원질 섬유의 감소와 세균이나 내독소에 의한 치근면 오염, 광물질의 밀도와 조성의 변화등을 들 수가 있는데<sup>36)</sup>, 동물실험에서 치주질환에 이환된 치근면에서 치주치료후 긴 접합상피로 치유되는 것을 보여줌으로써 치주질환에 이환된 치근면은 치주조직재생에 부적절함을 보여주었다<sup>37)</sup>. 치석제거술과 치근활택술을 시행하면 내독소에 오염된 치근면을 효과적으로 제거할 수 있으나<sup>38)</sup> 이것이 신생결합조직부착을 재생하지는 못한다. 이 경우에 긴 접합상피만으로 치유되는데 이때 구연산 탈회를 행하면 섬유아세포의 이동과 부착이 촉진된다<sup>39)</sup>. 구연산이 신생결합조직의 치근부착에 미치는 효과를 연구한 생체실험에서 pH 1의 구연산을 2-3분간 도포하여 탈회한 것이 가장 효과적이라고 보고하였으며, 그 이후 구연산을 이용한 치근면 탈회에 대한 연구들이 활발하게 시도되어져 왔다<sup>40,41)</sup>. 구연산의 도포는 치근면에 있는 세포독성인자를 제거하고 아울러 상아질 간질에 있는 교원섬유를 노출시켜

치유과정에서 새로운 섬유와 침착할 수 있는 적절한 근거를 마련해 주어 접합상피의 근단성 이동을 방지하여 신생결합조직의 부착을 촉진시킨다고 하였으며<sup>42,43)</sup>, 테트라사이클린도 비슷한 역할을 하는 것으로 보고되었다<sup>44-46)</sup>. 구연산과 테트라사이클린의 탈회효과를 비교한 연구에서 두 탈회물질은 도말층을 제거하는데는 동일한 효과를 나타내나 구연산이 테트라사이클린보다 훨씬 침투력이 강력하다고 하였다<sup>47)</sup>. 그러나 테트라사이클린으로 탈회시킨 경우에 구연산을 사용한 경우보다 섬유아세포의 부착이 더 잘 일어난다고 하는 보고도 있었다<sup>48)</sup>.

탈회에 대한 동물 실험에서도 대체로 비슷한 결과가 나왔으나 종종 치근흡수가 관찰되기도 하였다<sup>49)</sup>. 사람을 대상으로 하는 실험에서는 구연산 탈회시 치근흡수는 보이지 않았는데<sup>50)</sup> 어떤 연구에서는 조직학적 관찰에서 치주조직재생과 더불어 골재생이 나타나기도 하였다<sup>51)</sup>. 그러나 모든연구에서 이런 치주조직재생이 보고된 것은 아니다. 조직학적으로 탈회의 효과가 보이는 반면 임상적으로 탈회의 효과는 미미하다. 주사전자현미경과 광학현미경사진 관찰에서 구연산 탈회시에 결합조직부착이 증가된다는 보고도 있었으나<sup>52)</sup> 구연산으로 치근면을 탈회한 것이 신생결합조직부착이나 신생백악질형성을 일으키지 않는다고 연구도 있어<sup>53)</sup> 치근면의 탈회에 대한 상반된 연구결과를 보여준다.

또한 rhBMP-2가 치근의 교원질과 결합되는 성질이 있어, rhBMP-2 도포전에 치근면을 탈회시키면 BMP의 효과를 크게 할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 치근면 탈회등의 전처리를 통한 BMP 작용의 변화에 대해서도 몇몇 연구가 이루어졌다. 하지만 EDTA로 탈회한 후 rhBMP-2를 도포한 경우 치주인대세포의 분화를 촉진시켜 치주조직재생을 증가시켰지만<sup>54)</sup>, 인산으로 전처리후 BMP를 도포한 경우 초기의 골형성은 감소되었으나 BMP에 의한 신생백악질형성은 증가하였다고 보고되는 등<sup>55)</sup> 치근면 전처리와 BMP 작용의 변화에 대한 명확한 연구결과는 아직 없는 상태이다.

이 연구의 목적은 구연산 혹은 테트라사이클린으로 탈회된 치근절편상에서 rhBMP-2도포가 사람의

치주인대섬유아세포와 골아세포의 부착, 증식, 분화에 미치는 영향을 알아보는 데 있다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포배양

치주인대섬유아세포를 준비하기 위해 Somerman<sup>56)</sup>의 방법을 변형하여 배양하였다. 교정 치료를 받기 위해 서울대병원 치과진료부에 내원한 10대 후반에서 20대 초반의 건강한 성인에서 소구치들을 발치한 후 생리 식염수로 잘 세척하고 1%의 항생제 (penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml, amphotericin B 25 µg/ml, Gibco Co., U.S.A.)를 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco Co., U.S.A.)에 첨가하여 넣었다. 이 치아들을  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM; Gibco Co., U.S.A.)에 담근 후, 치근의 중앙 1/3부분에서 큐렛으로 치주인대조직을 조심스럽게 박리한 후 배양접시에 세절하고 부착시켜 37°C 5% CO<sub>2</sub>를 포함한 공기 조건에서 배양하였다. 배양액으로는 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.)과 1%의 항생제 (penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)를 첨가한  $\alpha$ -MEM을 사용하였고, 2-3일 마다 배지를 갈아 주었다. 세포들은 일단 밀생될 때까지 배양한 후 1:4의 비율로 계대배양하였고, 이 연구에서는 3-4회 계대배양된 치주인대섬유아세포를 이용하였다.

골아세포는 MC3T3-E1(Riken, Japan) 세포 주를 5-6회 계대배양한 후 이용하였다. 사용한 배지와 배양 조건은 치주인대섬유아세포의 경우와 동일하게 하였다.

### 2. 치근 절편의 준비

잔존골의 양이 치근단 1/3이하이고 최근 6개월간 치주치료를 받지 않은 환자에서 치주질환을 이유로 발치한 80개의 치아를 레진으로 포매한 후, Exakt cutting system(Exakt Apparateb, Hamburg, Ger-

many)을 이용하여 치아의 수직면으로 세절하여 치아절편을 얻었다. 포매한 레진은 치아를 세절한 후 모두 제거하였으며 절편의 크기는 4×2.5×1mm로 하였다.

치근절편들은(288개) 치근면의 처리에 따라서 다음과 같이 6군으로 분류하였으며 각군은 48개씩이었다.

- 1군 : 치근면의 처리가 없음(대조군)
- 2군 : 치근절편을 rhBMP-2로 도포(BMP군)
- 3군 : 치근절편을 구연산으로 처리(CA군)
- 4군 : 치근절편을 구연산으로 처리한 후 rhBMP-2를 도포(CA+BMP군)
- 5군 : 치근절편을 테트라사이클린으로 처리(TC군)
- 6군 : 테트라사이클린으로 처리한 후 rhBMP-2를 도포(TC+BMP군)

### 3. 치근 절편의 탈회

준비한 치근절편을 증류수로 잘 씻은 후 96개의 절편은 구연산(Sigma, U.S.A.)으로 1분간 탈회시켰고, 96개의 절편은 10% 농도의 테트라사이클린(Tetracycline HCl, Chonggeundang, Korea.)으로 3분간 탈회시켰다. 구연산은 pH=1.0으로 조절하여 탈회에 이용하였고, 테트라사이클린은 10% 농도로 증류수에 녹인 후 pH meter(Benchtop pH/ISE Meters, Orion, U.S.A.)로 측정한 결과 pH=2.04로 나왔다. 탈회시킨 절편을 다시 잘 씻은 후 모든 절편을 1000U/ml penicillin과 1000 µg/ml streptomycin 용액을 넣은  $\alpha$ -MEM에 24시간을 둔 후, 100U/ml penicillin 과 100 µg/ml의 streptomycin을 첨가한  $\alpha$ -MEM으로 잘 씻었다.

### 4. rhBMP-2를 이용한 치근 절편의 표면 처리

rhBMP-2(R&D system®, U.S.A.)는 도포하기 직전에 10%의 FBS와 1%의 항생제용액(penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml, amphotericin B 25 µg/ml, Gibco Co., U.S.A.)이 함유된  $\alpha$ -MEM 배지를 이용하여 30 µg/ml의 농도로

회석하여 사용하였다. 미리 분류된 BMP군, CA+BMP군 그리고 TC+BMP군의 절편들을 30 µg/ml의 rhBMP-2용액에 10분간 담그고, 10분 후 절편을 무균상태에서 건조시켰다.

## 5. 세포 접종

각군의 치근절편들을 반씩(24개) 나누어 각각 치주인대섬유아세포와 골아세포주의 접종을 위해 사용하였다. 배양한 치주인대섬유아세포와 골아세포주를 각각 0.25%의 trypsin과 4mM EDTA를 혼합한 효소용액 0.5ml에 넣고서 37℃에서 10분간 반응시켜 탈리시킨 후, 원침(1200rpm, 4℃, 10분)하여 수집하였다. 10%의 FBS와 1%의 항생제용액, 10mM Naβ-glycerolphosphate(Sigma, U.S.A.), 50 µg/ml의 L-ascorbic acid(Sigma, USA), 그리고, 10<sup>-7</sup>M Dexamethasone(Sigma, U.S.A.)이 포함된 α-MEM 배지를 준비하였고, 이 배지에서 수집한 세포가 5 × 10<sup>4</sup>cell/ml 농도가 되도록 하였다. 24-well culture plate(Nunc, Rochester, NY, USA)에 치근 절편을 well당 1개씩 위치시킨 후, 세포가 들어있는 배지를 well당 1ml 씩 접종하였다. 세포-치근절편을 95% air, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 조건의 배양기에서 실험기간동안 배양하였다. 7일째에 관찰한 세포에서는 배양 3일 후에 배지를 1ml씩 첨가해 주었다.

## 6. 세포수의 측정

배양 2일과 7일째에 각 well의 치근절편을 꺼내어 각각 1.5ml 튜브에 넣고 100 µl의 효소용액(0.25% trypsin in 4mM EDTA)으로 세포를 탈리시킨 후, 곧바로 튜브를 진탕하여 세포부유액이 균일하도록 혼합하고 광학현미경하에서 혈구측정기로 세포 수를 측정하였다.

## 7. 알칼리성인산효소 활성의 측정

치주인대섬유아세포와 골아세포주의 알칼리성 인산효소활성을 Bessey<sup>57)</sup>의 방법대로 측정하였다.

1mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM sucrose, 5mM tris-HCl buffer (pH=9.8) 그리고 2mM p-nitrophenylphosphate (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan)의 반응액을 미리 준비하여, 2일 및 7일째 치근 절편을 각각 5 개씩 well에서 꺼내어 25mM의 sucrose용액으로 씻은 후, 다시 새로운 24 well 배양접시로 옮겼다. 준비한 반응액을 각 well 당 300 µl 씩 넣어 치근 절편이 잠기도록 하였다. 반응액과 세포-치근절편이 들어있는 24 well 배양접시를 37℃ 수조로 옮겨 반응이 일어나도록 하였고, 30분 후에 24 well 배양접시를 얼음위에 위치시키고 0.6N 1.5ml의 NaOH를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 각 well에서 반응이 일어난 용액을 200 µl 씩 96 well 배양접시로 옮기고, spectrophotometry를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 알칼리성인산효소의 활성은 분해된 p-Nitrophenol의 양으로 나타내었다.

## 8. 단백질 양 측정

알칼리성인산효소 활성을 측정한 후, 세포가 부착되어있는 치근절편을 25mM의 sucrose에 2번 씻고 10%의 SDS(sodium dodecylsulfate, Sigma, U.S.A.)를 100 µl 씩 첨가하여 흔들어 주면서 세포를 용해시킨 후, 세포의 단백질농도를 Bradford<sup>58)</sup>의 방법대로 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, U.S.A.)를 이용해서 595nm의 흡광도로 측정하였다. 흡광도를 단백질 양으로 환산하기 위하여 Bovine serum albumin을 표준으로 하였다.

## 9. 주사전자현미경 관찰

표면에 세포가 배양된 치근 절편을 새로운 24 well 배양접시로 옮겨 well당 1.0ml씩 2.5% glutaraldehyde를 넣었다. 4℃에서 20분간 고정한 후, PBS로 씻은 후, 1% aqueous OsO<sub>4</sub>(Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA)를 이용하여 20분 동안 후고정을 하였다. 에탄올에서 70, 80, 90, 95, 100% 순서로 탈수과정을 거친 후, 표본을 금박한 후에 주사전자현미경(Jeol, U.S.A.)으로 관찰하였다.

## 10. 통계처리

모든 측정을 3회 이상 반복하여 평균±표준편차 (M±S.D)로 표시하였다. SPSS 8.0(SPSS, U.S.A.)을 이용하여 통계분석을 시행하였는데, 각 군에 있어서 2일 째와 7일째의 자료를 비교하기 위하여 t-test를 하였으며 각 군간의 세포수, 단백질농도, 그리고 알칼리성인산효소의 활성을 비교하기 위하여 ANOVA를 하였다. 다중분석을 위해서는 Tukey 방법을 사용하였다.

## III. 연구 결과

### 1. 치주인대섬유아세포 배양군

#### 1) 세포수의 측정

배양 2일 째에는 모든 군에서 유의한 차이는 없었다.

배양 7일 째에는 대조군에 비하여 CA군과 CA+BMP군에서 유의하게 높은 세포증식을 보였으나, BMP군에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. CA군에서 가장 높은 세포증식이 관찰되었으며, CA+BMP군은 CA군에 비해 조금 적었고, TC군과 TC+BMP군은 낮게 나타났다.

각 군내에서의 배양 2일 및 7일간의 비교에서, CA군과 CA+BMP군이 배양 7일째 에서 유의성있게 높았다(Table 1, Figure 1).

#### 2) 단백질 정량

배양 2일 째에 각군을 대조군과 비교하였을 때, CA군, CA+BMP군, TC군 그리고 TC+BMP군에서 유의하게 높은 단백질합성이 관찰되었고, BMP군과 비

Table 1. Cell number of PDL cells cultured on dentin slices(Number/mm<sup>2</sup>).

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Day 2	236±52.7*	312±89.2	362±62.6	338±73.6	310±54.3	304±68.8
Day 7	308±55.4*	548±144.3	836±176.2	794±213.6	582±196.5	558±164.5
			①	①		

\*, Means±S.D.

(①): There were significant differences between Group 1(control) and each group(p<0.01).

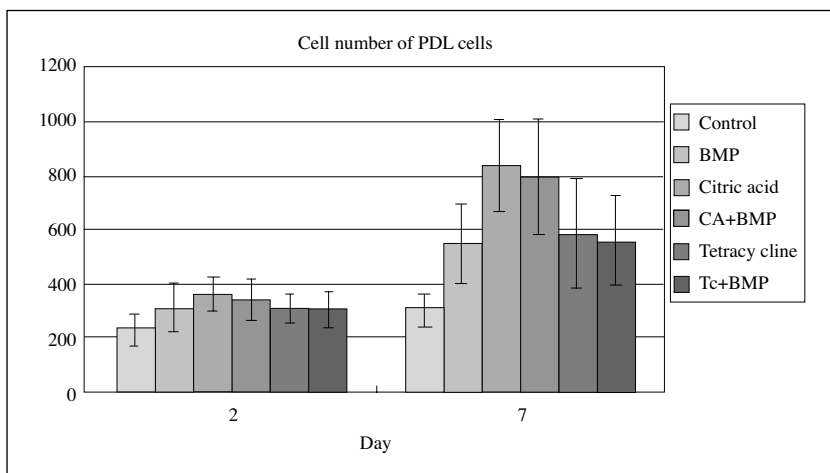


Figure 1. Cell number of PDL cells cultured on dentin slices(Number/mm<sup>2</sup>).

Table 2. Protein Assay of PDL cells cultured on dentin slices( $\mu\text{g protein/mm}^2$ )

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Day 2	4.22 $\pm$ 0.55*	4.63 $\pm$ 1.11	8.21 $\pm$ 1.08	8.27 $\pm$ 1.17	7.20 $\pm$ 0.91	7.15 $\pm$ 0.58
			①, ②	①, ②	①, ②	①, ②
Day 7	6.32 $\pm$ 1.70	7.91 $\pm$ 1.93	12.41 $\pm$ 2.07	11.20 $\pm$ 1.51	9.62 $\pm$ 1.64	9.20 $\pm$ 1.84
			①	①		

\*, Means $\pm$ S.D.

①: There were significant differences between Group 1(control) and each group( $p < 0.01$ ).

②: There were significant differences between Group 2(BMP) and each group( $p < 0.01$ ).

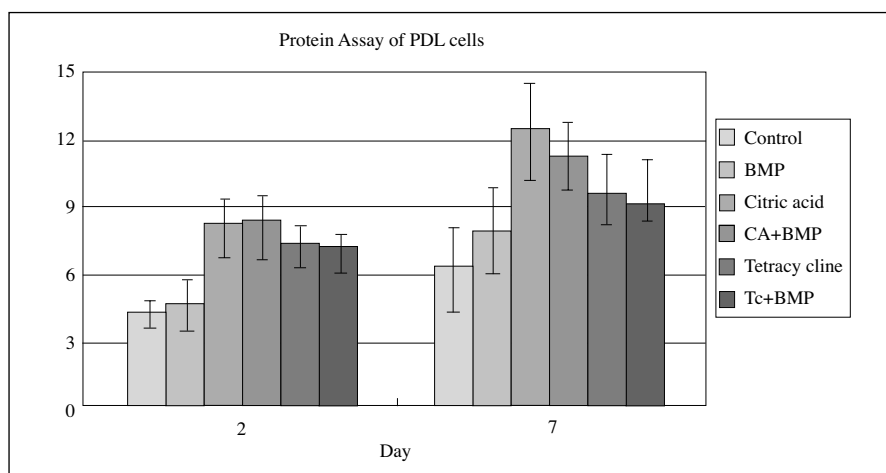


Figure 2. Protein Assay of PDL cells cultured on dentin slices( $\mu\text{g protein/mm}^2$ ).

교하였을 때에도 역시 CA군, CA+BMP군, TC군 그리고 TC+BMP군에서 유의성 있는 차이를 보였다. 이 중에서 CA군과 CA+BMP군이 TC군과 TC+BMP군에 비해 유의성 있게 높은 단백질합성이 나타났다.

배양 7일 때에는 대조군과 비교하였을 때 CA군, CA+BMP군에서 유의하게 높은 단백질합성을 보였고, BMP군과 비교하였을 때에는 CA군과 CA+BMP군에서 높은 단백질합성이 관찰되었으나 유의한 차이가 나타나지는 않았다. 전체적으로 볼 때, 배양 2일 때와 7일 때에서 CA군과 CA+BMP군에서 대조군에 비해 유의하게 높은 단백질합성능을 보였고 BMP군에서는 유의한 차이를 나타내지는 않았다.

각 군내에서 배양 2일 및 7일을 비교하였을 때에는 CA군과 CA+BMP군에서 7일째에 유의성 있는 단

백질합성 증가를 보였다(Table 2, Figure 2).

### 3) 알칼리성인산효소 활성

배양 2일 때에 각군을 대조군과 비교하였을 때, BMP군과 CA+BMP군에서 유의하게 높은 알칼리성 인산효소활성을 보였다. CA군에서는 대조군보다는 높게 나타났으나, CA+BMP군보다는 낮게 관찰되었다.

배양 7일 때에는 각군을 대조군과 비교하였을 때, BMP군과 CA+BMP군에서 유의하게 높은 알칼리성 인산효소활성이 관찰되었는데, BMP군에서 가장 높게 나타났고, CA+BMP군 그리고 TC+BMP군의 순이었다. CA군은 대조군에 비해 많은 증가를 보이지 않았으며, BMP군과 비교하였을 때에 유의성 있게 작게 나타났다.

Table 3. ALP activity of PDL cells cultured on dentin slices(nmolPNP/min/ $\mu$ g protein).

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Day 2	34.4 $\pm$ 11.7*	66.0 $\pm$ 17.6	48.2 $\pm$ 13.4	52.8 $\pm$ 11.7	44.4 $\pm$ 10.5	48.6 $\pm$ 8.2
	②	①		①		
Day 7	59.8 $\pm$ 14.5	143.2 $\pm$ 23.8	74.6 $\pm$ 16.6	124.2 $\pm$ 25.6	76.4 $\pm$ 20.3	83.8 $\pm$ 28.3
	②	①	②	①	②	②

\*, Means $\pm$ S.D.

(①: There were significant differences between Group 1(control) and each group(p<0.01).

(②: There were significant differences between Group 2(BMP) and each group(p<0.01).

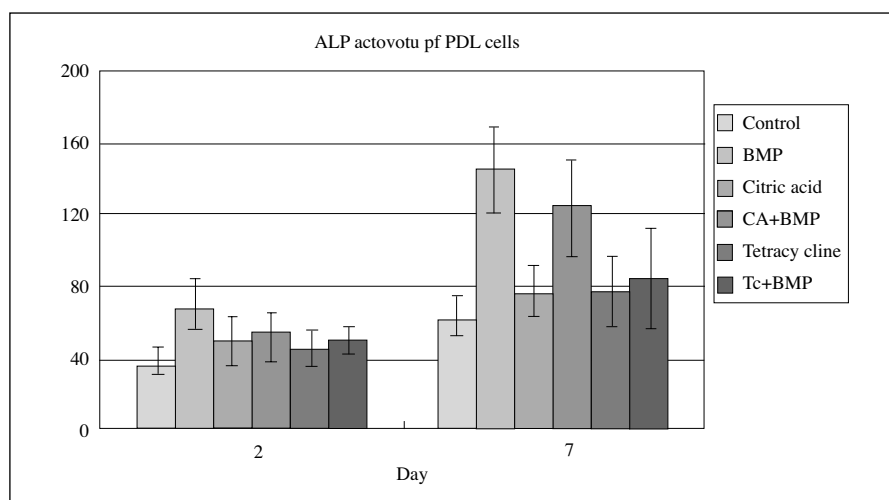


Figure 3. ALP activity of PDL cells cultured on dentin slices(nmolPNP/min/ $\mu$ g protein).

배양 2일 제와 7일 제의 결과를 전체적으로 살펴 보면, CA+BMP군에서 2일과 7일 모두에서 대조군에 비해 유의성있게 높은 효소활성도를 나타냈고, BMP 군과 CA+BMP군 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

각 군내에서 배양 2일과 7일을 비교하였을 때에는 BMP군과 CA+BMP군에서 유의성 있게 높은 효소활성을 보였다(Table 3, Figure 3).

## 2. 골아세포 배양군

### 1) 세포 수의 측정

배양 2일 제에 CA군에서 세포증식이 관찰되었고,

CA+BMP군에서도 CA군 다음으로 높게 나타났다. 대조군과 비교하였을 때, CA군, CA+BMP군, TC군 그리고 TC+BMP군에서 유의성있게 높은 세포증식을 보였고, BMP군과 비교하였을 때에도 역시 CA군, CA+BMP군, TC군 그리고 TC+BMP군에서 유의성있는 높은 값을 나타내었다.

배양 7일 제에는 대조군과 비교하여, 모든 군에서 유의성있게 높은 세포증식이 관찰되었고, BMP군과 비교하였을 때에는 CA군에서 유의성있게 높게 관찰되었으며, 유의성은 없었으나 CA+BMP군에서 증가를 보였다. 2일 제와 7일 제를 종합하여 보면, CA 군에서 대조군과 BMP군에 비해 유의성 있게 높은 세포증식을 보였고, CA+BMP군에서도 대조군과

Table 4. Cell number of Osteoblasts cultured on dentin slices(Number/mm<sup>2</sup>).

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Day 2	258±40.8*	364±52.7	446±55.5	436±47.7	398±58.9	396±60.7
			①, ②	①, ②	①, ②	①, ②
Day 7	374±70.6	742±128.5	1062±164.2	984±157.7	782±114.0	772±131.7
		①	①, ②	①	①	①

\*, Means±S.D.

(①: There were significant differences between Group 1(control) and each group(p<0.01).

(②: There were significant differences between Group 2(BMP) and each group(p<0.01).

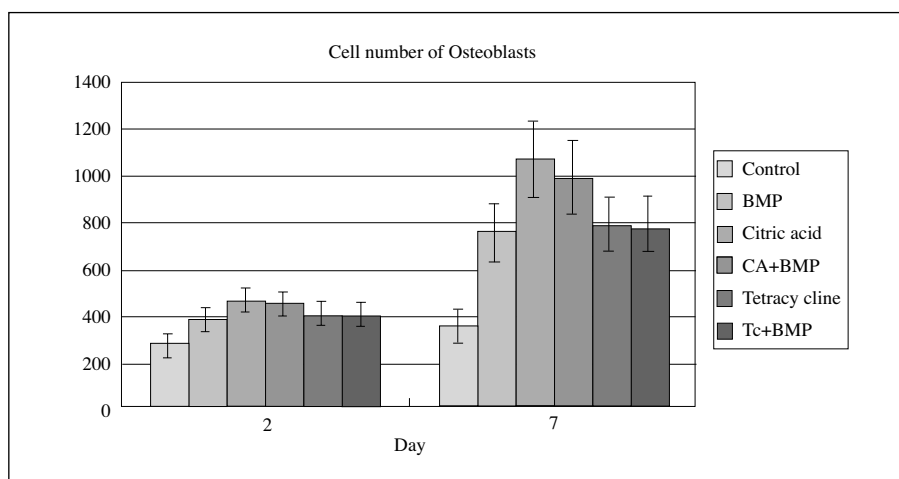


Figure 4. Cell number of Osteoblasts cultured on dentin slices(Number/mm<sup>2</sup>).

BMP군에 비해 상당히 높은 세포증식을 나타내었다.

배양 2일과 7일에서 각 군내의 비교에서는, 대조군을 제외한 모든 군에서 7일째에 유의하게 높은 세포증식을 보였다(Table 4, Figure 4).

## 2) 단백질 정량

배양 2일 째에 대조군과 비교하였을 때, CA군과 CA+BMP군에서 유의하게 높은 단백질 합성을 나타내었다.

배양 7일 째에는 대조군과 비교하였을 때, CA군, CA+BMP군 그리고 TC군에서 유의하게 높은 단백질 합성을 나타내었고, BMP군과 비교하였을 때에는 CA군에서 유의하게 높은 값이 관찰되었다. 배양 2일

째와 7일 째를 종합하여 보면, CA군과 CA+BMP군에서 2일과 7일 모두 대조군에 비해 유의하게 높은 단백질합성을 보였고, BMP군에 비해서도 상당히 높은 단백질합성을 나타내었다.

배양 2일과 7일에서 각 군내의 비교에서는, 대조군을 제외한 모든 군에서 7일째에 유의하게 높은 단백질합성이 관찰되었다(Table 5, Figure 5).

## 3) 알칼리성 인산효소활성

배양 2일 째에는 모든 군간에 유의성 있는 차이가 없었다.

배양 7일 째에는 대조군과 비교하여 BMP군과 CA+BMP군에서 유의하게 높은 알칼리성 인산효소활성이 나타났는데, BMP군에서 가장 높았고,



Table 5. Protein Assay of Osteoblasts cultured on dentin slices( $\mu\text{g protein/mm}^2$ ).

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Day 2	5.67 $\pm$ 0.92*	7.14 $\pm$ 1.26	9.24 $\pm$ 1.31	8.92 $\pm$ 1.16	8.20 $\pm$ 1.40	8.42 $\pm$ 1.21
			①	①		
Day 7	6.78 $\pm$ 1.30	10.40 $\pm$ 2.07	15.21 $\pm$ 2.29	13.70 $\pm$ 2.12	11.71 $\pm$ 2.28	11.40 $\pm$ 2.46
			①	①	①	

\*; Means $\pm$ S.D.

①: There were significant differences between Group 1(control) and each group( $p < 0.01$ ).

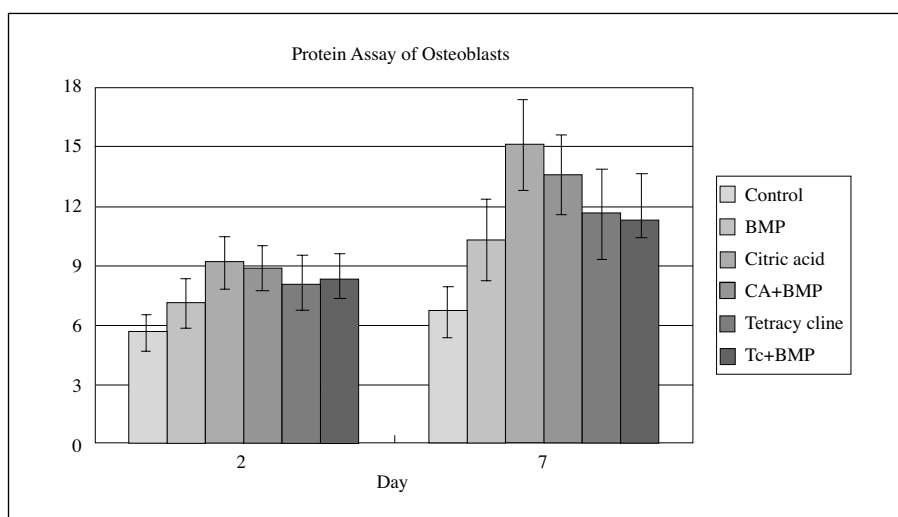


Figure 5. Protein Assay of Osteoblasts cultured on dentin slices( $\mu\text{g protein/mm}^2$ ).

CA+BMP군 그리고 TC+BMP군의 순이었으며, CA군에서는 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. BMP군과 CA+BMP군간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다.

배양 2일과 7일에서 각 군내에서 비교하였을 때에는, BMP군, CA+BMP군 및 TC+BMP군에서 유의하게 높은 알칼리성인산효소의 활성을 보였다(Table 6, Figure 6).

### 3. 주사전자현미경을 통한 관찰

배양 2일 및 7일 쯤에 각 군의 치근절편에 부착, 증식된 세포들을 주사전자현미경을 통해 관찰하였다. 치근절편에 부착된 치주인대섬유아세포와 골아세포

들은 비슷한 부착양태를 보였는데, 방추형으로 치아 절편에 부착되어 증충으로 증식되고 있는 모습을 관찰할 수 있었다(Figure 7-11).

치주인대섬유아세포 및 골아세포 모두에서 대조군과 BMP군에 비하여 CA군, CA+BMP 및 TC군, TC+BMP군에서 보다 현저히 많은 부착세포가 관찰되었다.

치주인대섬유아세포 및 골아세포들은 대조군, BMP군 및 CA군과 CA+BMP군의 경우 치근절편의 절삭흔적을 따라 길이방향으로 세포들이 일정한 방향성을 가지고 배열하면서 방추형으로 얇고 넓게 부착, 증식되는 소견을 보였으나 TC군, TC+BMP군의 경우는 세포질이 수축하면서 많은 세포돌기를 내고 있고 구상 및 성상으로 변형된 세포들이 일정한 방

Table 6. ALP activity of Osteoblasts cultured on dentin slices(nmolPNP/min/ $\mu$ g protein)

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Day 2	50,8 $\pm$ 9,5*	70,6 $\pm$ 9,9	57,2 $\pm$ 12,7	65,6 $\pm$ 9,6	52,8 $\pm$ 8,3	54,0 $\pm$ 8,8
Day 7	80,2 $\pm$ 21,5	195,4 $\pm$ 62,5	111,2 $\pm$ 35,3	185 $\pm$ 46,0	104 $\pm$ 39,6	162 $\pm$ 41,9
	②	①		①		

\*, Means $\pm$ S.D.

(①: There were significant differences between Group 1(control) and each group(p<0,01).

(②: There were significant differences between Group 2(BMP) and each group(p<0,01).

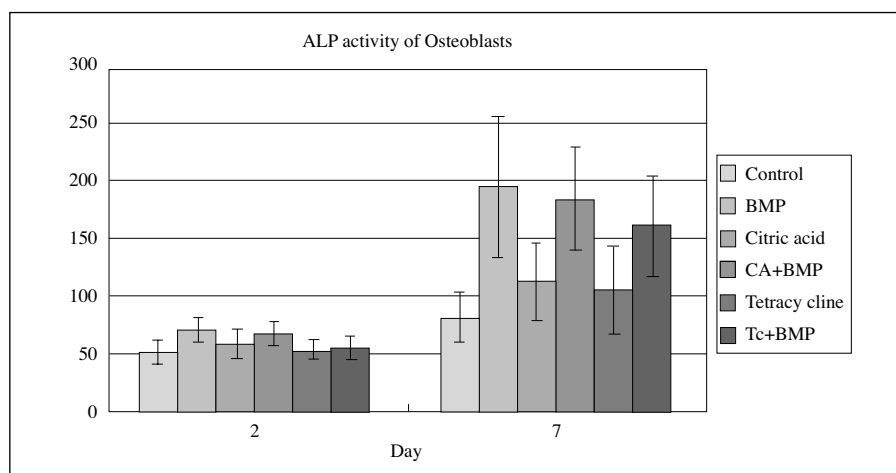


Figure 6. ALP activity of Osteoblasts cultured on dentin slices(nmolPNP/min/ $\mu$ g protein).

향성이 없이 중층의 망상으로 불규칙하게 부착된 모습이 관찰되었다. Figure 7은 BMP군에 치주인대섬유아세포가 부착된 모습을 보여주고 있는데, 부착된 세포 사이사이로 도말층이 관찰된다. Figure 8은 CA군에 치주인대섬유아세포가 부착된 사진인데, 구연산에 의해 노출된 상아세관이 관찰되고, 세포들이 치근절편에 잘 부착하고 있으며, 세포돌기들이 활발하게 뻗어나가고 있다. Figure 9는 CA+BMP군에 골아세포가 부착된 것인데, 세포돌기들이 골고루 잘 뻗어나가고 있고, 치근절편의 대부분이 증식한 세포에 의해 덮혀 있음을 관찰할 수 있다. 상아세관은 잘 구분이 되지 않는데, 증식한 세포와 골형성유도단백질 도포에 의해 가려졌기 때문으로 여겨진다. Figure 10은 TC군에 치주인대섬유아세포가 부착된 사진이며, 테

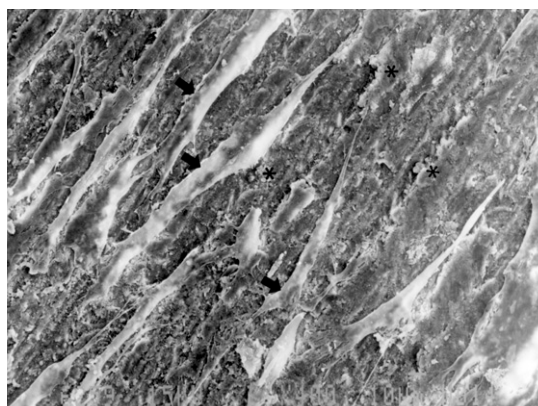


Figure 7. SEM view of group 2 with periodontal ligament cells two days after seeding(x400). Smear layer can be seen(\*). Arrow marks indicates attached PDL cells. Cell attachment occurred in limited area.

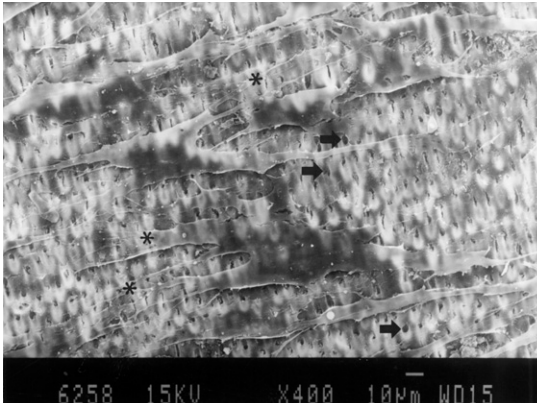


Figure 8. SEM view of group 3 with periodontal ligament cells two days after seeding(x400). PDL cells are well attached to the etched dentin surfaces and evenly distributed through all the dentin surfaces. Fully extended cell processes(\*), exposed dentinal tubules(arrow marks) can be seen.

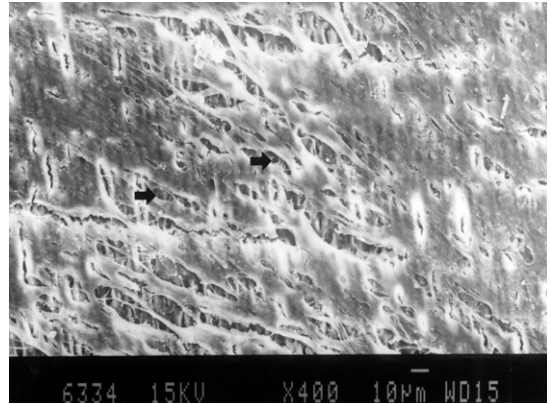


Figure 9. SEM view of group 4 with osteoblasts two days after seeding(x400). Almost all of the dentin surfaces are covered with seeded cells. The cells are in good shape and cell processes are well extended. Dentinal tubules(arrow marks) can be seen in the picture. Left arrow mark indicates obscure dentinal tubule which might be due to BMP-2 treatment.

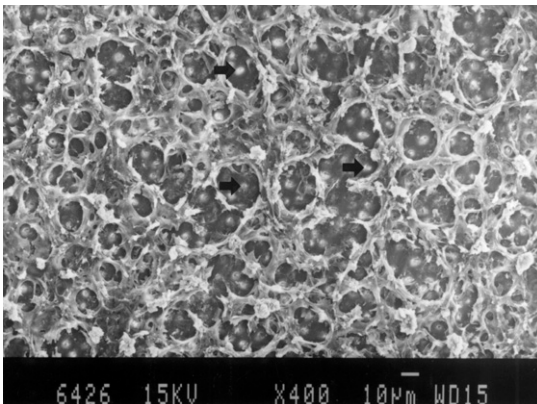


Figure 10. SEM view of group 5 with periodontal ligament cells two days after seeding (x400). Attached cells are narrow in shape, and cell processes extensions are limited. Exposed dentinal tubule (arrow mark) can be seen.

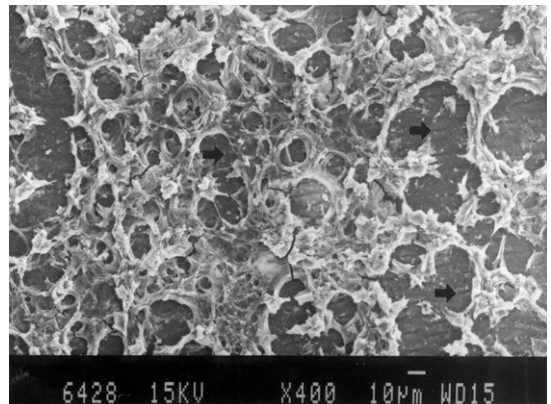


Figure 11. Sem view of group 6 with periodontal ligament cells two days after seeding (x400). Cell morphology is similar to Fig 10. Dentinal tubules(arrow marks) is obscure in the picture.

트라사이클린에 의한 탈회로 상아세관이 노출되어 있음을 볼 수 있다. 세포질이 수축하면서 세포돌기를 내고 있고, 구상 및 성상으로 변형된 세포들이 일정한 방향성이 없이 불규칙하게 부착된 모습이 관찰

된다. Figure 11은 TC+BMP군에 치주인대섬유아세포가 부착된 사진인데, 세포의 모양은 Figure 10과 유사하며, 골형성유도 단백질에 의해 가려져서 상아세관이 희미하게 드러나 보인다.

#### IV. 총괄 및 고안

치주조직재생을 위해 BMP를 이용하는 많은 연구들이 진행되어 왔는데, 동물실험에서 피하조직이나, 근육 등 골형성이 되지 않는 조직에 이식된 BMP가 이소골형성을 유도할 수 있다는 사실이 여러 연구를 통해 확인되었고<sup>20,22-24)</sup>, 또한 치주조직재생에 필수적인 세포인 치주인대섬유아세포를 포함하여 골아세포 등에 대한 작용에 대한 보고가 있다<sup>25)</sup>. BMP의 치주조직재생에 대한 작용뿐만 아니라, 임플란트주위염에서의 골재생이나 상악동골증대술에서의 골재생 효과에 관하여도 이미 여러 연구에서 확인된 바 있으나<sup>30-32)</sup>, 치주조직재생을 위한 BMP 적용시 치근면에 도포하는 BMP의 적용방법과 치근면의 조건에 따른 치주조직재생세포의 반응에 대한 연구는 아직 드물다. 이 연구에서는 구연산 및 테트라사이클린에 의한 치근면 탈회 후에 rhBMP-2를 도포하는 것이 치주인대섬유아세포와 골아세포의 부착, 증식 및 분화에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다.

세포의 증식활동을 보기 위해 우선 단백질 합성능과 세포수를 측정하였는데 구연산을 도포한 군에서 단백질합성능과 세포수가 대조군에 비해 크게 높은 결과가 나타난 것으로 보아, 치근면의 탈회가 치주인대섬유아세포 및 골아세포의 부착에 보다 양호한 환경을 제공하고 이와 더불어 세포증식에 보다 유리한 여건으로 작용한 것으로 생각된다. BMP군에서는 대조군에 비하여 유의하게 다른 차이를 보이고 있지 않은데, 이는 rhBMP-2가 세포증식과정에 작용하지 않는다는 이전의 연구결과와 일치한다<sup>54)</sup>. 그러나 치근면을 구연산으로 탈회시킨 후 rhBMP-2로 처리한 경우 BMP를 단독으로 사용한 군에 비하여 현저히 높은 단백질 합성능과 세포증식이 관찰되었는데, 이는 치근면 탈회로 인한 세포부착증진과 증식촉진효과에 기인한 것으로 보여진다. 즉 세포의 증식에는 rhBMP-2가 큰 영향을 미치지 않지만, 탈회된 치근면에서는 세포의 부착과 증식이 잘 일어나서 rhBMP-2를 단독으로 사용한 경우보다 단백질의 합성이 증가한 것이라고 할 수 있다. 테트라사이클린으로 치근면을 탈회시킨 경우에는, 세포수와 단백질의 합성능

이 높게 나타나긴 하였으나, 구연산으로 탈회시킨 군에 비하여는 상대적으로 낮았는데, 이로 미루어 보아 구연산에 의한 탈회가 테트라사이클린에 비하여 세포의 부착에 더 효과적인 전처리방법인 것으로 생각된다. 테트라사이클린으로 탈회시킨 군에서는 주사전자현미경 소견에서 세포모양의 변화가 관찰되었는데, 이는 PDGF와 IGF를 테트라사이클린으로 전처리한 치근에서의 배양시에 테트라사이클린에 의한 부착증진의 효과는 볼 수 없었고 치주인대섬유아세포의 변형이 관찰되었다는 Gamal 등<sup>59)</sup>의 연구결과와 유사한 소견을 보이고 있다. 이들은 치근면에 잔존한 테트라사이클린이 성장인자의 물리적 화학적 성질변화를 야기한 것으로 생각하였다. 또한 여러 연구에서 치근면 탈회시 탈회물질의 산성에 의한 부작용에 대하여도 설명하고 있는데, 탈회물질의 산성이 성장인자의 생활성도를 변화시킬 가능성에 관해서도 주목하고 있다. 산성의 치근면 탈회물질이 치아주위조직에 괴사등의 해로운 작용을 미치지 않는다는 연구결과도 있었으나<sup>60)</sup>, 구연산젤의 산도가 세포에 영향을 미치므로 치주조직에 닿지 않도록 처리하는 것이 필요하다는 주장도 있었다<sup>61)</sup>. 또한 산도가 낮은 물질로 3분간 치근면을 탈회시키면 괴사효과가 있어 일시적으로 창상면 치유에 해로운 작용을 할 수 있는 반면에 1분정도로 짧게 치근면을 처리한 경우에는 치근면 탈회에 의한 주위조직의 괴사가 일어나지 않고 치주조직의 상피화를 막아서 결합조직의 형성을 촉진하므로 37%의 인산으로 20초 정도 탈회를 시키는 것이 바람직하다는 보고도 있었다<sup>62)</sup>. 그러나 본 연구에서는 단백질 합성능이나 알칼리성 인산효소활성이 대조군에 비해서 증가하였고, 또한 구연산의 산도가 테트라사이클린보다 더 낮았음에도 불구하고 구연산으로 탈회시킨 후 rhBMP-2로 처리한 경우에서 좋은 결과를 보인 것으로보아 탈회물질의 산성이 rhBMP-2의 생활성도를 변화시킨 것 같지는 않다.

치주조직재생을 위해서는 치은상피세포의 치근단이동을 막고 새로운 결합조직의 부착을 증진시켜야 하지만 치주질환에 이환된 치근면은 세균과 내독소로 오염이 되어있어 새로운 결합조직의 부착이 방해

를 받게 된다. 따라서 치석, 치태 및 오염된 백악질의 철저한 기계적 제거와 더불어 치근탈회를 포함한 치근면의 적절한 처리가 요구되는데, 치근탈회의 기본 개념은 치주조직재생을 담당할 간엽세포의 이동과 부착 및 분화와 증식이 효과적으로 일어날 수 있는 치근면의 물리적, 생화학적 환경변화를 도모하는 것이라 할 수 있다. 그러나 현재까지의 결과들은 치근면 탈회의 효과에 대한 상반된 결과들이 보고되고 있다. Rompen 등<sup>63)</sup>은 치주인대섬유아세포를 3% 구연산이나 2.5% 미노사이클린으로 처리한 상아질 분말과 같이 배양한 결과 24시간 후에 세포증식, 단백질 합성, 교원질 합성과 같은 치주조직재생에 필수적인 생합성을 모두 증진시켰으며, 투과전자현미경사진에서도 세포돌기의 뚜렷한 증가를 보여 확실하게 생합성이 증가되는 것을 보여주었다고 보고하였다. 그러나 Erdinc<sup>64)</sup>은 치주관막수술시에 테트라사이클린으로 치근면을 5분간 처리한 경우 수술만을 시행한 대조군에 비해 2주 및 4주째 치은지수가 약간 향상되긴 하였으나 부착수준의 증가를 보이지는 않아 치근면 탈회가 치주조직재생 측면에서는 더 나은 결과를 나타내지 않았다고 주장하였다. 또한 Madison 등<sup>65)</sup>은 테트라사이클린에 의한 상아질층의 처리시에도 말층의 제거와 상아세관의 노출로 인해 치주조직의 부착을 증대시킬 수 있을 것이라고 제안하였다. 한편 rhBMP-2는 교원질 기질과 결합되는 성질이 있으므로, 교원질을 노출시킴으로써 rhBMP-2가 치근면의 결합을 증진시킴으로써 보다 장기간 치근면에 rhBMP-2를 유지시키고 유효농도의 서방형 유리 기전을 도모할 수 있을 것으로 기대된다.

rhBMP-2 처리시에 치근면 탈회의 효과를 살펴본 연구에서<sup>22)</sup> 37% 젤형태의 인산으로 치근면을 처리한 후 rhBMP-2를 도포하여 10일째와 38일째의 골형성을 관찰한 결과 10일째에는 대조군에 비해 더 많은 골형성이 관찰되었으나 38일째는 대조군과 별 차이가 없었다. 또한 다른 연구에서는<sup>55)</sup> 35% 인산으로 치근면을 처리해서 10일 후에 관찰한 결과 대조군에 비해 골형성이 감소하고 골유착이 증가한 반면 백악질의 형성은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다고 보고하였다. 즉 낮은 pH로 치근면을 처리한 후

rhBMP-2 처리를 하면 골형성은 둔화되지만 백악질 형성은 증가된다고 하였는데 이것은 신생백악질 형성이 신생골형성보다 늦게 진행되므로 탈회에 의해 치근면에서 rhBMP-2 유리의 지연이 가능해져서 대조군에 비해 백악질의 합성이 증가된 것으로 해석될 수 있다.

효과적인 rhBMP-2의 농도에 관해서는 여러 연구가 있었는데, rhBMP-2를 1 $\mu$ g/ml과 3 $\mu$ g/ml의 농도로 사용한 연구에서<sup>54)</sup> 2일째부터 rhBMP-2에 의한 효과가 나타나고 4일째에 그 값이 증가하였으나 7일째에는 대조군에 비해 별다른 차이가 나지 않았는데, 이는 사용한 rhBMP-2의 농도가 낮아 지속적인 BMP의 유리가 가능하지 않았기 때문이라고 하였다. 또한 50, 100, 200 $\mu$ g/ml의 농도에서 농도차에 따른 rhBMP-2의 효과의 차이는 없었다는 연구결과도 있으며<sup>44)</sup>, rhBMP-2가 50ng/mL의 농도 이상에서 인간의 하악골에서 채취한 골세포의 분화를 촉진시킨다고 보고된 바도 있다<sup>66)</sup>. Kobayashi 등<sup>26)</sup>은 rhBMP-2가 50ng/mL 이상의 농도에서 사람의 치주인대섬유아세포에서 골아세포 분화의 초기 marker인 알칼리성 인산효소활성과 부갑상선호르몬(PTH) 의존 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate의 축적을 증가시킨다고 하여 rhBMP-2가 치주인대섬유아세포의 골아세포 분화를 촉진한다고 하였다. 본 연구에서는 이상의 여러 연구결과들을 참고하여 시행한 예비실험을 통해, 가장 좋은 결과를 보인 30 $\mu$ g/ml의 rhBMP-2를 사용하였다.

이 연구에서 알칼리성인산효소의 활성측정결과, rhBMP-2로 처리한 군에서 크게 증가한 것을 볼 수 있는데, 이는 rhBMP-2가 골아세포의 증식에는 별로 관여하지 않는 반면에 세포의 분화를 촉진하기 때문인 것 같다. 즉 rhBMP-2는 성장인자라기 보다는 분화인자로 작용을 한다고 할 수 있으며, 이번 연구에서는 rhBMP-2가 골아세포의 알칼리성인산효소의 활성을 크게 증가시킨 것으로 나타나 rhBMP-2가 골세포로의 분화를 촉진시킨다는 것을 확인시켜 주었다. 세포는 증식이 일단 어느정도 진행되고 나면 분화과정이 시작되는데 세포의 증식과정이 과다하게 일어나면 골세포로의 분화과정은 더디게 진행될 수도 있

다. Takayama등<sup>67)</sup>은 bFGF에 의해서 치주인대세포의 증식이 빨라지자 치주인대세포를 골아세포로 분화시키는 작용이 억제되면서 분화보다는 증식쪽으로 세포분열주기를 변화시켜 알칼리성인산효소의 활성이 낮아졌다고 하였다. 치주조직이 재생되기 위해서는 여러 세포들의 적절한 작용으로 세포의 증식과 분화과정이 조화롭게 진행되어야 한다. rhBMP-2는 세포의 증식을 유도하지는 않으나 구연산으로 처리한 치근면에서는 세포의 증식이 rhBMP-2를 단독으로 처리한 경우보다는 유의성 있는 수준으로 높아졌고 이는 탈회에 의해 치근면이 세포의 부착에 용이하게 됨으로써 부착된 세포의 증식이 크게 증대되었다고 볼 수 있다. 또한 구연산으로 전처리후 rhBMP-2를 도포한 경우 rhBMP-2를 도포하지 않은 경우에 비해 알칼리성 인산효소활성이 높게 관찰되었는데, 이 결과로 미루어 보아 구연산 전처리 후 rhBMP-2의 사용이 세포의 증식과 분화에 함께 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 이 연구는 배양 2일째와 7일째의 관찰에 그쳤으므로 좀 더 장기간에 걸친 연구가 필요하며, 이와 함께 rhBMP-2의 농도차이에 따른 변화에 대한 연구도 진행되어야 할 것이다. 또한 최근에 치근면 처리를 위한 탈회약제의 산도에 의한 치주조직에의 부작용이 계속 보고되고 있으므로, 탈회약제의 산도에 따른 부착세포의 반응변화에 대하여도 부가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결론

구연산과 테트라사이클린으로 처리한 치근면에 도포한 rhBMP-2가 치주인대섬유아세포와 골아세포의 부착, 증식, 분화반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포수, 단백질합성능, 알칼리성 인산효소활성을 측정하고 주사전자현미경하에서의 관찰을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치근면을 구연산으로 탈회시킨후 rhBMP-2를 도포한 경우, 단백질 합성능과 세포수, 알칼리성 인산효소활성이 모두 대조군에 비해 유의성

있게 높았다. 단백질 합성능과 세포수의 경우 구연산 탈회군과는 비슷하였고, rhBMP-2만 도포한 군보다는 높았으나 유의한 수준은 아니었다. 알칼리성 인산효소활성은 rhBMP-2만 도포한 군과 비슷하였고 구연산 탈회군보다는 유의성있게 높게 관찰되었다.

2. 치근면을 테트라사이클린으로 탈회시킨후 rhBMP-2를 도포한 경우, 단백질 합성능과 세포수, 알칼리성 인산효소활성이 대조군에 비해 어느정도 높게 나타났으나 구연산으로 탈회한 경우에 비해서는 상대적으로 적었다. rhBMP-2만 도포한 군에 비해서도 세포수와 단백질 합성능이 높게 관찰되었으나 유의한 수준은 아니었으며, 알칼리성 인산효소활성은 오히려 크게 낮았다. 또한 주사전자현미경조건에서 일부 세포들의 세포질이 수축하면서 불규칙하게 부착되는 모습이 관찰되었다

## VI. 참고문헌

1. Ramfjord S. Present status of the modified Widman procedure. J Periodontol 1977;48:558-563
2. Isidor F, Karring T, Attstrom R. The effect of root planing as compared to that of surgical treatment. J Clin Periodontol. 1984;11:669-81.
3. Froum SJ, Coran M, Thaller B, Kushner L, Scopp IW, Stahl SS. Periodontal healing following open debridement flap procedures. I. Clinical assessment of soft tissue and osseous repair. J Periodontol 1982;53:8-14
4. Machtei EE, Ben-Yehouda A. The effect of post-surgical flap placement on probing depth and attachment level: a 2-year longitudinal study. J Periodontol. 1994;65:855-8.
5. Palcanis KG. Surgical pocket therapy. Ann Periodontol. 1996;1:589-617. Review
6. Moskow BS, Karsh F, Stein SD. Histological assessment of autogenous bone graft. A case report and critical evaluation. J Periodontol.

- 1979;50:291-300.
7. Dragoo MR, Sullivan HC. A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. II. External root resorption. *J Periodontol*. 1973;44:614-25.
8. Carraro JJ, Sznajder N, Alonso CA. Intraoral cancellous bone autografts in the treatment of infrabony pockets. *J Clin Periodontol*. 1976;3:104-9.
9. Garraway R, Young WG, Daley T, Harbrow D, Bartold PM. An assessment of the osteoinductive potential of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model. *J Periodontol*. 1998 ;69:1325-36.
10. Zybutz MD, Laurell L, Rapoport DA, Persson GR. Treatment of intrabony defects with resorbable materials, non-resorbable materials and flap debridement. *J Clin Periodontol*. 2000;27:169-78.
11. Becker W, Becker BE. Treatment of mandibular 3-wall intrabony defects by flap debridement and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. Long-term evaluation of 32 treated patients. *J Periodontol*. 1993;64:1138-44.
12. Warrer K, Caton JG, Reid T. A prospective multicenter study evaluating periodontal regeneration for Class II furcation invasions and intrabony defects after treatment with a bioabsorbable barrier membrane: 1-year results. *J Periodontol*. 1996;67:641-9.
13. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, Sanchez R. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol*. 1992;63:929-40.
14. Eickholz P, Kim TS, Steinbrenner H, Dorfer C, Holle R. Guided tissue regeneration with bioabsorbable barriers: intrabony defects and class II furcations. *J Periodontol*. 2000;71:999-1008.
15. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993;64:142-148
16. Dennison DK, Valon DR, Pinero GI, Rittman B, Caffesse RG. Differential effect of TGF- and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblast. *J Periodontol* 1994;65:641-648
17. Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, Lynch SE. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontal Res*. 1996;31:301-12.
18. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howel TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989;16:545-548.
19. Nishimura F, Terranova VP. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. *J Dent Res*. 1996;75:986-92.
20. Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J Periodontol*. 1995;66:506-10.
21. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 1999;19:40-58.
22. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res*. 1997;76:1460-70.

23. Kuboki Y, Sasaki M, Saito A, Takita H, Kato H. Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-applied tissue engineering. *Eur J Oral Sci*. 1998;106:197-203.
24. Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8:154-63.
25. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol*. 1999;70:1026-31.
26. Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R, Yamaguchi A, Deguchi K, Shionome M, Miyazawa Y, Nishihara T, Nagumo M, Hasegawa K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *J Dent Res*. 1999;78:1624-33.
27. Urist MR, Mikulski AJ, Nakagawa M, Yen K. A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. *Am J Physiol*. 1977;232:C115-27.
28. Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjo UM. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol*. 1995;66:131-8.
29. Ripamonti U, Heliotis M, Rueger DC, Sampath TK. Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Arch Oral Biol*. 1996;41:121-26.
30. Barboza EP, Duarte ME, Geolas L, Sorensen RG, Riedel GE, Wikesjo UM. Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. *J Periodontol*. 2000;71:488-96.
31. Howell TH, Fiorellini J, Jones A, Alder M, Numikoski P, Lazaro M, Lilly L, Cochran D. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997;17:124-39.
32. Terheyden H, Jepsen S, Moller B, Tucker MM, Rueger DC. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res*. 1999;10:510-21.
33. King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodontal Res*. 1998;33:226-36.
34. Wikesjo UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, Jin L, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol*. 1999;26:392-400.
35. Stewart HT. Partial removal of cementum and decalcification of tooth in the treatment of pyorrhea alveolaris. *Dent. Ckosmos*, 41:617, 1899. (cited by 19)
36. Selvig KA, Hals D. Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and electron microscopy. *J Periodont Res* 1977;12:419-429
37. Polson AM, Caton J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. *J Periodontol*. 1982;53:617-25.
38. Aleo JJ, De Renzis FA, Farber PA. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J Periodontol*. 1975;46:639-45.
39. Pitaru S, Melcher AH. Organization of an oriented fiber system in vitro by human gingival



- fibroblasts attached to dental tissue: relationship between cells and mineralized and demineralized tissue. *J Periodontal Res*. 1987;22:6-13.
40. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. *J Periodontol*. 1975;46:646-55.
  41. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. II. Defect repair. *J Periodontol*. 1976;47:497-505.
  42. Nightingale SH, Sheridan PJ. Root surface demineralization in periodontal therapy: subject review. *J Periodontol*. 1982;53:611-6.
  43. Garrett JS, Crigger M, Egelberg J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J Periodontal Res*. 1978;13:155-63.
  44. Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, DiFlorio RM, Terranova VP. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodontal Res*. 1986;21:322-9.
  45. Bjorvatn K. In vitro study by fluorescence microscopy and microradiography of tetracycline-tooth interaction. *Scand J Dent Res*. 1983;91:417-24.
  46. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, Wikesjö UM. Biochemically mediated periodontal regeneration. *J Periodontal Res*. 1987;22:248-51.
  47. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, DiFlorio RM, Lyall RM, Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontal Res*. 1986;21:330-7.
  48. Stahl SS, Froum SJ. Human clinical and histologic repair responses following the use of citric acid in periodontal therapy. *J Periodontol*. 1977;48:261-6.
  49. Bogle G, Adams D, Crigger M, Klinge B, Egelberg J. New attachment after surgical treatment and acid conditioning of roots in naturally occurring periodontal disease in dogs. *J Periodontal Res*. 1981;16:130-3.
  50. Isidor F, Karring T, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on citric acid treated roots. *J Periodontal Res*. 1985;20:421-30.
  51. KA. Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. *J Periodontal Res*. 1980;15:1-9.
  52. Albair WB, Cobb CM, Killoy WJ. Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization. *J Periodontol*. 1982;53:515-26.
  53. Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. *J Periodontol*. 1992;63:303-9.
  54. Zaman KU, Sugaya T, Kato H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. *J Periodontal Res*. 1999;34:244-50.
  55. King GN, King N, Hughes FJ. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol*. 1998;69:561-70.
  56. Somerman MJ, Archer SY, ImmGR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988;67:66-70.
  57. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946;164:321-329.

58. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
59. Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1998;25:404-12.
60. Seymour GJ, Romaniuk K, Newcomb GM. Effect of citric acid on soft tissue healing in the rat palate. *J Clin Periodontol.* 1983;10:182-7.
61. Lan WC, Lan WH, Chan CP, Hsieh CC, Chang MC, Jeng JH. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Aust Dent J.* 1999;44:123-30.
62. Blomlof J, Jansson L, Blomlof L, Lindskog S. Long-time etching at low pH jeopardizes periodontal healing. *J Clin Periodontol.* 1995;22:459-63.
63. Rompen EH, Goffinet GH, Nusgens B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an in vitro study. *J Periodontol.* 1999;70:1144-52.
64. Erdinc M, Efeoglu A, Demirel K. Clinical evaluation of the effect of tetracycline hydrochloride root conditioning during flap surgery. *Periodontal Clin Investig.* 1995;17:6-9.
65. Madison JG 3rd, Hokett SD. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. *J Periodontol.* 1997;68:739-45.
66. Takiguchi T, Kobayashi M, Suzuki R, Yamaguchi A, Isatsu K, Nishihara T, Nagumo M, Hasegawa K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblast differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandibulae. *J Periodontal Res.* 1998;33:476-85.
67. Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1997;32:667-75.

## Effect of Citric Acid and Tetracycline HCl Root Conditioning on rhBMP-2 on Human Periodontal Ligament Fibroblast and Osteoblast Cell

Jung-Min Shim<sup>1</sup>, Soo-Boo Han<sup>1</sup>, Yang-Jo Seol<sup>1,2</sup>, Yong-Moo Lee<sup>1</sup>, Kyeong-Hwa Kim<sup>1</sup>, Seung-Beom Kye<sup>2</sup>, Sang-Mook Choi<sup>1</sup>, Chong-Pyoung Chung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology and Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

<sup>2</sup>Department of Dentistry, College of Medicine, Sungkyunkwan University

The goal of periodontal treatment is predictable periodontal regeneration. But until now, many products including GTR materials and growth factors are beyond of complete regeneration.

BMP can induce ectopic bone formation when implanted into sites such as rat muscle and can greatly enhance healing of bony defects when applied exogenously. BMP can promote periodontal regeneration by their ability to stimulate new bone and new cementum formation. But little is known about optimal conditions required for the application. Root conditioning is used for bioactive root change so altered root surface provides a substrate that promotes chemotaxis, migration and attachment of periodontal cells encouraging connective attachment to the denuded root surface. The aim of this study is to investigate whether the acid conditioning change effect of rhBMP-2 on human periodontal ligament cell and osteoblast cell line. 288 periodontally involved root dentin slices are divided into 6 groups, each 48, 1)control, 2)treated with BMP, 3)treated with citric acid 4)treated with citric acid+BMP 5)treated with tetracycline 6)treated with TC+BMP. Each group was divided half, so 12 root dentin slices were seeded with periodontal ligament cells and 12 were seeded with osteoblasts. At day 2 and 7, cell number, protein assay, ALP activity was measured. To investigate morphology of cultured cells, SEM was employed. Statistical analysis was performed with SPSS 8.0 either t-test or ANOVA test.

The results are ; Protein assay and cell number was slightly decreased in CA+BMP group compared to CA group but it was not statistically significant and ALP activity was much more increased in CA+BMP group compared to CA group so there was no statistically significance between BMP and CA+BMP group and statistically significant compared to control group.

Cell number and protein assay was slightly increased in TC group and ALP activity was much less than BMP group and CA group. Cell number and protein and ALP activity was not much increased in TC+BMP group. TC group and TC+BMP group showed cell morphology change in SEM. This results suggested that application of root surface with citric acid before BMP treatment might give better result in periodontal regeneration.

---

Key word : PDL cell, osteoblast, citric acid, tetracycline, attachment, proliferation, differentiation