

법랑기질 단백질 유도체가 치주인대양세포 및 조골양세포에 미치는 영향

김동운¹ · 정진형¹ · 임성빈¹ · 고선일²

¹단국대학교 치과대학 치주과학교실, ²단국대학교 치과대학 생화학교실

I. 서론

치주치료의 궁극적인 목적은 파괴된 치주조직 결손부에 신생골과 신생백악질의 형성 그리고 그 사이에 기능적으로 배열된 치주인대가 형성 되도록 하는 치주조직의 재생에 있다. 과거의 여러 치료방법들은 대부분 긴 접합상피결합¹⁻²⁾, 치근흡수³⁻⁴⁾, 골유착⁵⁻⁶⁾ 등의 결과를 초래하여 치주조직의 재생이라는 원래의 목적을 이룰 수 없었다. 그러나 최근에 치주조직 재생에 관여하는 여러 조직의 성질과 이들 각종 세포의 고유 성상이 규명되고 세포의 화학적 특성이 밝혀지면서 이들 치유에 관여하는 세포의 생성 및 활성을 조절하려는 노력이 시행되어져 왔다. 이밖에 PDGF 등의 성장인자⁷⁾나 혈소판 농축혈장이 조골세포에 미치는 영향 등⁸⁾에 대해서도 많은 연구가 있어 왔으며 성장인자들이 치주인대세포를 활성화시켜 치주조직 재생에 효과가 있다고 한 보고⁹⁻¹¹⁾도 있었다.

골내 결손 증례에서 골 이식과 조직유도 재생술을 이용하여 신부착을 일으키는데 대하여도 많은 연구가 진행되어 왔다¹²⁻¹³⁾. 그러나 자가골 이식에 있어서는 이식재를 얻기 위해 부가적으로 이치수술이 요구되기 때문에 환자에게 불편감을 주게 되고 동종골 이식 또한 질병전염의 가능성과 환자의 거부감이 있을 수 있다. 이에 치폐막을 이용한 조직유도 재생술식으로 치주조직 재생을 일으키는 여러 학자의 연구가 있으나

비흡수성 차폐막은 제거를 위한 2차 수술이 단점이며, 연조직 노출 시 세균 감염의 위험성도 갖고 있다.

최근에는 법랑기질 단백질 유도체가 효과적으로 동물 및 사람에서 치주 부착기관을 재생시키며¹⁴⁻¹⁸⁾, 사람에서 임상적 부착 높이를 증가시키는 것으로 보고 되고 있다¹⁹⁻²⁰⁾. 인간 치주조직의 골내 결손부에 법랑기질 단백질 유도체를 사용하여 얻은 조직학적 평가에서 신부착이 일어남을 밝힌 연구 등²¹⁾이 있으며 골내 결손부 치료에 법랑기질 단백질 유도체를 사용 후 얻은 연조직과 경조직의 개선 정도는 흡수성 차폐막으로 결손부를 치료한 결과와 비슷하다는 보고도 있었다²²⁾. 치근면에 법랑기질 단백질 유도체를 사용하는 재생 술식의 생물학적 원리는 새로운 백악질 형성과 적절한 부착 구조의 발생에 기초하여 활택된 치근표면에 도포된 법랑기질 단백질 유도체 층이 새로운 무세포성 백악질 침착을 촉진하며 새로운 치주인대와 치조골을 형성하는 것이다²³⁾.

법랑기질 단백질 유도체의 주단백질은 아멜로제닌으로 알려져 있으며 전체 기질의 90%를 차지한다. 나머지 10%는 protein-rich amelogenin, tuftsin, 혈청 단백질과 타액 단백질 등으로 구성되어 있다. 이러한 법랑기질 단백질 유도체로 구성된 Emdogain은 치주 병소에 사용 시 상피 세포의 증식을 억제하며 치주인대 및 조골세포를 활성화시켜 새로운 백악질²⁴⁾ 및 치주인대와 골조직의 생성을 유도한다고 보고

되고 있다²²⁾.

조골세포와 치주인대세포의 활성을 측정하기 위한 방법으로 사용되는 염기성 인산분해효소 활성은 백악질 형성을 증가 시키며²⁵⁾ 치주조직 재생에 관여하는 세포들의 분화에도 중요한 역할을 하는 것으로²⁶⁾ 알려져 있다. 따라서 조골세포와 치주인대세포에 법랑기질 단백질 유도체를 적용시켜 염기성 인산분해 효소 활성이 증가 되는 것은 치주 조직의 재생에 필요한 세포들의 분화에 영향을 끼친다 할 수 있다.

법랑기질 단백질 유도체는 치주질환에 이환된 치아에서 신부착 형성을 촉진시키는 효과가 있다고 한다²⁷⁾. 이와 같이 법랑기질 단백질 유도체가 치주조직 재생에 좋은 치료 효과가 있음이 임상적으로 보고되고 있으나 생화학적 기전에 기초한 세포수준의 연구가 부족하였다.

이에 본 연구에서는 이러한 법랑기질 단백질 유도체를 이용하여 조골양세포 및 치주인대양 세포와의 세포부착 및 증식을 관찰하였으며 또한 염기성 인산분해효소 활성도 등을 측정하여 법랑기질 단백질 유도체가 조골양세포 및 치주인대양 세포에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 법랑기질 단백질 유도체의 준비 및 실험군 설계

본 연구에서의 법랑기질 단백질 유도체는 돼지의 발생중인 법랑질에서 추출된 것으로서 본 연구에서는 Emdogain(Biora, Sweden)을 사용하였다.

30mg/ml 단위로 되어 있는 Emdogain을 10mM glacial acetic acid로 희석하여 0.03 μ g/ml, 3 μ g/ml, 300 μ g/ml 농도의 3가지 실험군의 법랑기질 단백질 유도체를 조골양세포 및 치주인대양세포의 실험에 사용하였다. 대조군으로는 아무것도 첨가하지 않은 조골양세포와 치주인대양세포를 사용하였다.

이때 실험에 필요한 법랑기질 단백질 유도체의 농도를 정하기 위하여 MG63 세포의 생존율에 미치는 영향을 측정하여 세포 생존율을 높게 나타내는 0.03 μ g/ml, 3 μ g/ml, 300 μ g/ml의 농도를 실험에 사용하였다.

2. 조골세포 및 치주인대 세포의 배양

조골세포의 실험모델로 사용된 세포로는 사람 및 흰쥐의 골육종에서 유래된 세포주인 MG63 세포와 ROS17/2.8세포를 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 치주인대 세포는 발거된 건강한 치아의 치근부위에서 분리하여 사용하였다. 배양액은 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, USA)에 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco, USA)을 첨가하여 사용하였으며, 일주일에 2회 교환하고 일주일 간격으로 1:10으로 계대 배양하였다. 배양시 온도는 37℃, 습도는 95%를 유지하였고 계속하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다.

3. 세포 생존을 측정

조골세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 법랑기질 단백질 유도체를 처리 후 96-well plate에서 48시간 배양한 후 배양이 끝나기 3시간 전에 배양액에 50 μ g/well MTT(Sigma, USA)용액을 첨가하였다. 그 후 상층액을 제거하고 0.04 N HCl isopropanol로 30분 동안 염색제를 용해시킨 후 microplate absorbance reader(SLT 400)를 이용하여 550nm에서 비색 정량하였다. 측정된 흡광도는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

4. 세포 부착량 측정

세포 부착량을 검사하기 위하여 조골양세포와 치주인대양세포를 2 \times 10⁴cells/well이 되도록 법랑기질 단백질 유도체가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, USA) 배양액으로 세포 현탁액을 만들어 24-well plate에 분주한 후 1, 4 및 8 시간동안 부착시켰다. 시간이 경과한 후 세포를 고정하고 1% toluidine blue 용액으로 염색하여 광학현미경(Nikon, Japan)하에서 관찰하였다.

5. 세포 부착도 측정

세포 부착도를 검사하기 위하여 24-well plate에 범랑기질단백질유도체를 0, 0.03 μ g/well, 3 μ g/well, 300 μ g/well의 농도로 첨가하여 24시간 후 세척한 후 조골양세포와 치주인대양세포를 10⁵cells/well이 되도록 분주하여 30분, 1, 2, 4시간 후 부착되지 않은 세포를 제거한 후 부착된 세포를 trypsin-EDTA(Gibco, USA)용액으로 분리하여 광학현미경(Nikon, Japan)하에 hemocytometer를 이용하여 계수하였다.

6. 세포 증식도 측정

세포 증식도를 검사하기 위하여 조골양세포와 치주인대양세포를 24-well plate에 well 당 2 \times 10⁴개의 세포가 되도록 분주하여 배양하면서 세포가 단층을 이루기 전 범랑기질단백질유도체를 여러 가지 농도(0.03 μ g/ml, 3 μ g/ml, 300 μ g/ml)로 처리하고 2일간 배양한 후 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 부착된 세포를 모아 인산 완충 생리식염수(D-PBS, pH 7, Gibco, USA)로 희석시킨 후 광학현미경(Nikon, Japan)하에서 hemocytometer를 이용하여 계수하였다.

7. 염기성 인산분해효소 활성 측정

염기성 인산분해효소 활성 검사를 위해 조골양세포와 치주인대양세포를 96-well plate에 well 당 5 \times 10³개의 세포가 되도록 분주하여 배양한 후 2% FBS가 포함된 배양액내에 범랑기질단백질유도체를 처리하였다. 48시간 후 0.1% Triton X-100/saline으로 세포추출액을 만들어 효소 활성에 사용하였다. 염기성 인산분해효소 활성은 100 mM의 *p*-nitrophenyl phosphate(pNPP, Sigma, USA)를 기질로 glycine-NaOH buffer(pH 10.4)와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키며 기질인 pNPP로부터 유리되어 나온 PNP의 양을 흡광광도계(Shimadzu, Japan)를 이용하여 405nm 에서 비색 정량하였다.

8. 골형성 촉진인자 활성측정

골형성에 필수적인 전사인자로 알려진 Runx2의

활성도에 미치는 범랑기질단백질유도체의 영향을 측정하였다. 본 연구에서는 Runx2가 결합하는 DNA sequence인 OSE2를 6개 직렬 연결한 후 pGL3 promoter vector에 삽입한 6xOSE2-Luc vector를 transient transfection한 C2C12 세포를 이용하였다. 이 세포를 6-well plate에 well 당 2.5 \times 10⁵ 개가 되도록 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 범랑기질단백질유도체를 0.16% BSA가 포함된 DMEM에 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 bright glo lysis buffer (Promega, WI, USA) 500 μ l로 세포를 처리한 후 bright glo substrate(Promega, WI, USA)를 동량 첨가하여 5분간 반응시킨 후 Runx2의 활성도를 luminometer(Junior, EG&G BERTHOLD, Australia)를 사용하여 측정하였다.

9. 석회화결절 형성 측정

조골양세포와 치주인대양세포를 24-well plate에 분주하여 세포가 단층으로 증식한 후 매 2-3일마다 50 μ g/ml ascorbic acid(Sigma, USA)와 10mM β -glycerophosphate(Sigma, USA)를 혼합한 신선한 배양액으로 교환하며 여러 농도의 범랑기질단백질유도체를 처리하였다. 처리를 시작한 19일 후 3.7% formalin으로 세포를 고정하고 3% silver nitrate 용액을 넣어 직사광선에서 15-30분간 반응시킨 후 toluidine blue로 대조염색을 시행하였다. 염색이 완료된 후 광학현미경상에서 석회화결절의 형성을 관찰하였다.

10. 통계처리

본 실험의 통계처리는 Student's *t* test 방법을 사용하며, 값은 평균과 표준 오차로 나타냈다.

III. 연구결과

1. 예비 실험 결과

실험에 적합한 범랑기질 단백질 유도체의 농도를

정하기 위해 0~3000 $\mu\text{g/ml}$ 의 범랑기질단백질유도체 농도 하에 MG63 세포의 생존율을 측정하였다. 농도 Group당 4개의 MG63 세포 표본을 사용하였다. 48 시간 후 MG63 세포의 생존율을 대조군에 대해 백분율로 나타낸 결과 0.03 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되었다($p < 0.01$)(Figure 1).

특히 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 높은 값을 나타냈으며 실험에 사용된 모든 농도에서 세포 생존율이 높게 나타났다.

2. 세포 부착량 관찰

조골세포주인 MG63 세포를 범랑기질단백질유도체가 포함된 DMEM 배양접시에 1, 4, 8시간 부착시킨 결과를 toluidine blue로 염색 후 광학현미경으로 관찰한 결과 1시간 동안 MG63 세포를 부착시킨 경우 10% FBS 만으로 처리한 대조군과 유사하나(Figure 10) 4시간 경과함에 따라 부착이 증가된 양상을 보였다(Figure 11).

8시간 후 에서는 범랑기질단백질유도체의 농도가 증가함에 따라 부착량이 증가되었으며, 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 큰 증가를 나타내었다(Figure 12).

치주인대양세포를 범랑기질단백질유도체가 포함

된 DMEM 현탁액 배양접시에 분주한 후 1, 4, 8시간 동안 부착시킨 결과 1시간 경과 후에는 대조군과 유사한 모습이 관찰되었고(Figure 13), 4시간 경과 후에는 범랑기질단백질유도체 농도가 3 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 감에 따라 부착이 증가됨을 관찰하였다(Figure 14). 8시간 경과 후에는 농도증가에 따라 부착량이 증가함을 볼 수 있었고, 특히 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 치주인대양세포들이 잘 부착된 양상을 관찰하였다(Figure 15).

3. 세포부착도 측정

범랑기질단백질유도체가 각 농도(0.03 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$)로 피막된 배양접시에서의 치주인대양 세포의 부착을 보기위해 30분, 1, 2 및 4시간 간격으로 부착된 세포의 수를 관찰한 결과 배양접시에 치주인대 세포를 분주 후 2시간 까지는 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았으나($P < 0.05$), 4시간 경과 후에 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 범랑기질단백질유도체 군에서 대조군에 비하여 부착된 치주인대양세포의 수가 현저히 증가된 양상을 보였다(Figure 2).

범랑기질단백질유도체가 피막된 배양접시에 ROS17/2.8 세포를 분주하고 30분 1, 2, 4시간 간격으로 범랑기질단백질유도체의 각 농도(0.03 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$,

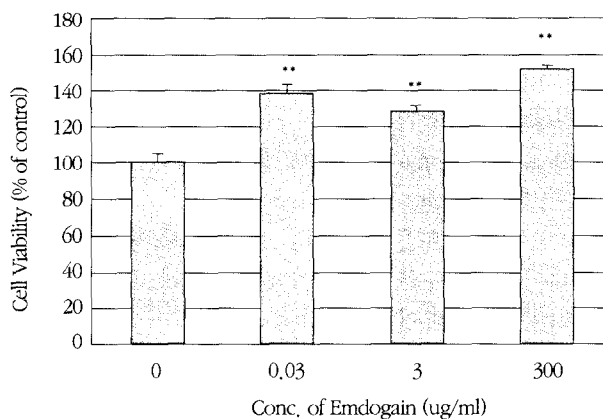


Figure 1. Effect of Emdogain on the viability of MG63 cells for 48 hours. Data represent mean \pm S.E. of 4 replicates

** : Significantly different from corresponding control($p < 0.01$)

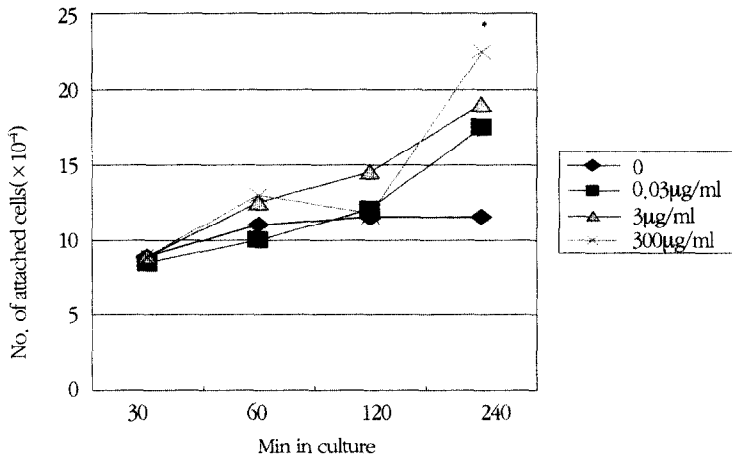


Figure 2. Effects of attachment of human PDL cells on Emdogain coated surface
*:Significantly different from corresponding control($p < 0.05$)

ml, 300µg/ml)에 따른 ROS17/2.8 세포의 부착도를 측정한 결과 300µg/ml의 범랑기질단백질유도체 농도에서 시간대별로 각각 대조군에 비해 부착된 ROS17/2.8 세포의 수가 현저히 높게 나타났다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Figure 3).

범랑기질단백질유도체와 다른 여러 성분과의 차이를 보기위해 여러 단백질, 혈청, 성장인자 등이 들어있는 10% FBS(fetal bovine serum)을 배양액에 첨가한 후 각 세포의 부착도를 측정해 보았다.

10% FBS가 첨가된 배양접시에 범랑기질단백질유도체를 각 농도(0.03µg/ml, 3µg/ml, 300µg/ml)로 피막하고 부착된 치주인대양세포의 수를 30분, 1, 2, 4시간 별로 관찰하니 배양접시에 치주인대양세포를 분주 후 60분까지는 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았으나 120분 경과 후범랑기질단백질유도체 농도가 0.03µg/ml, 300µg/ml인 실험군에서 유의한 차이가 있었으며($p < 0.05$), 240분 경과 후에는 범랑기질단백질유도체의 모든 농도군에서 대조군에 비해 부

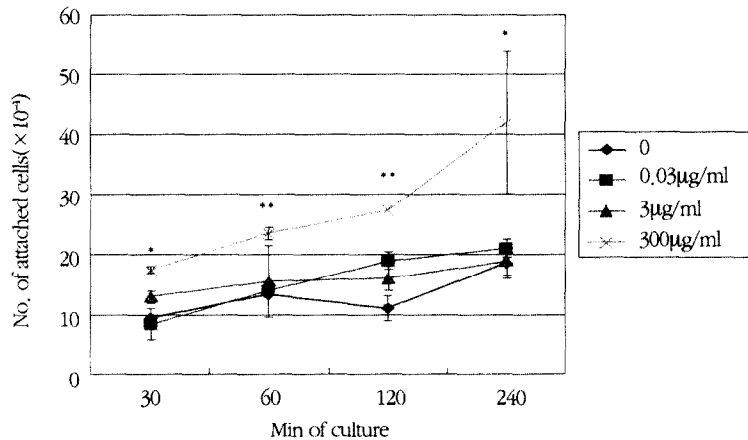


Figure 3. Effect of attachment of ROS17/2.8 cells on Emdogain coated surface
*:Significantly different from corresponding control($p < 0.05$)
**: Significantly different from corresponding control($p < 0.01$)

착된 치주인대양세포의 수가 유의성 있게 증가된 결과를 나타내었다($p < 0.05$)(Figure 4).

조골양세포의 부착도를 측정하기 위해 배양접시에 10% FBS를 첨가하고 범랑기질단백질유도체를 각 농도($0.03 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$, $300 \mu\text{g/ml}$)로 피막하고 ROS17/2.8 세포의 시간대에 따른 부착세포수를 30분, 1, 2, 4시간 대 별로 관찰하였다.

배양접시에 ROS17/2.8 세포를 분주 후 60분과 120분 경과후의 결과에서 범랑기질단백질유도체가 $3 \mu\text{g/ml}$, $300 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 피막된 군에서 부착된 ROS17/2.8 세포의 수가 유의성 있게 높은 결과를 나타내었다($p < 0.01$)(Figure 5). 그러나 240분 경과 후에는 각 농도별로 부착 세포의 수가 별 차이가 없음을 관찰하였다(Figure 5).

4. 세포 증식도 측정

조골양세포와 치주인대양세포를 분주, 배양하면서 범랑기질단백질유도체를 여러 농도($0.03 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$, $300 \mu\text{g/ml}$)로 처리한 배양접시에서 치주인대양세포의 증식도는 2일째 $3 \mu\text{g/ml}$ 의 범랑기질단백질유도체 농도에서 유의성 있는 세포수의 증가를 보였고($p < 0.05$), 3일째에는 범랑기질단백질유도체 $300 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 세포수의

증가를 보였다($p < 0.01$)(Figure 6).

MG63 세포를 배양시킨 경우는 3일째에 범랑기질단백질유도체 $300 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서($p < 0.01$), 4일째에는 $0.03 \mu\text{g/ml}$, $300 \mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서 대조군에 비해 현저히 증가된 세포수를 관찰하였다($p < 0.05$)(Figure 6).

5. 염기성 인산분해효소 활성 측정

치주인대양세포를 분주, 배양하고 배양액내에 각 농도($0.03 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$, $300 \mu\text{g/ml}$)의 범랑기질단백질유도체를 처리한 후 48시간 후에 범랑기질단백질유도체 농도에 따른 치주인대양세포의 염기성 인산분해 효소 활성을 측정시 $0.03 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$ 의 범랑기질단백질유도체 농도 까지는 대조군에 비해 유의한 증가가 없었으나, $300 \mu\text{g/ml}$ 농도의 범랑기질단백질유도체를 적용시킨 군에서는 통계적으로 유의성 있는 증가를 보였다($p < 0.05$)(Figure 7).

ROS17/2.8 세포에 각 농도($0.03 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$, $300 \mu\text{g/ml}$)의 범랑기질단백질유도체를 처리 후 48시간 후에 염기성 인산분해효소 활성을 측정한 경우 $0.03 \mu\text{g/ml}$ 의 범랑기질단백질유도체 농도에서는 대조군과의 차이가 없었으나 $3 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약간의 증가를 보였으며($p < 0.05$), $300 \mu\text{g/ml}$ 의 농도군에서는

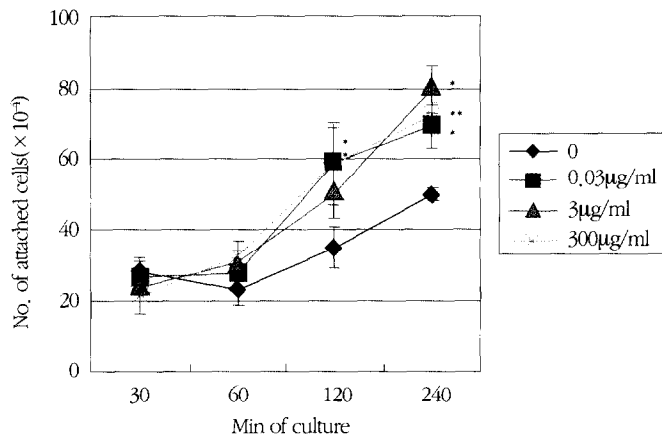


Figure 4. Effect of attachment of human PDL cells on Emdogain coated surface supplemented with 10% FBS

*:Significantly different from corresponding control($p < 0.05$)

**: Significantly different from corresponding control($p < 0.01$)

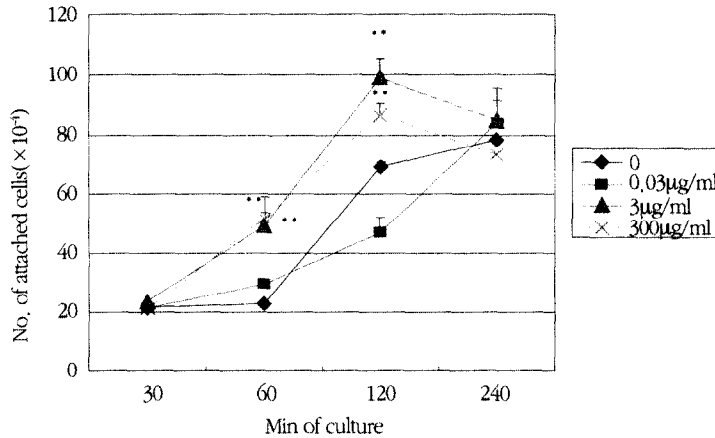


Figure 5. Effect of attachment of ROS17/2.8 cells on Emdogain coated surface supplemented 10% FBS

*:Significantly different from corresponding control(p < 0.05)

**: Significantly different from corresponding control(p < 0.01)

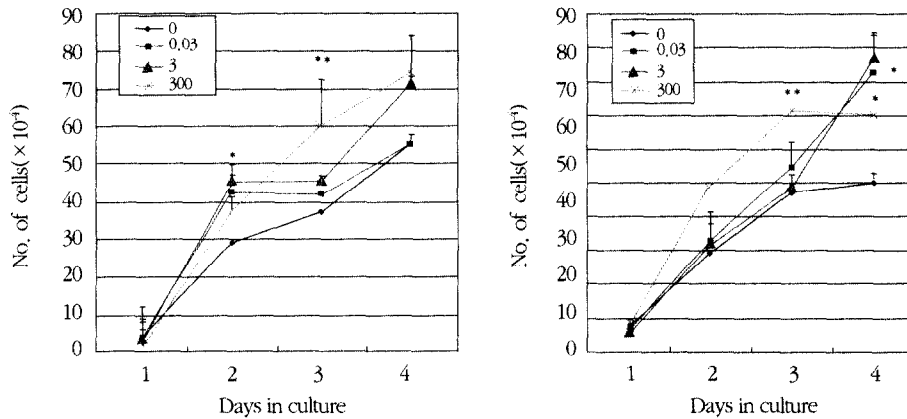


Figure 6. Time course effect of Emdogain on the cell proliferation in culture of PDL cells(A) and MG63 cells(B)

*:Significantly different from corresponding control(p < 0.05)

**: Significantly different from corresponding control(p < 0.01)

통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였다(p < 0.01) (Figure 8).

체의 각 농도별로 Luciferase 활성도의 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Figure 9).

6. 골형성 촉진인자 활성 측정

C2C12 세포를 분주 후 범랑기질단백질유도체를 각 농도(0.03 µg/ml, 3 µg/ml, 300 µg/ml) 별로 배양한 후 Runx2의 활성도를 측정한 경우 범랑기질단백질유도

7. 석회화 결절 형성 측정

치주인대양세포를 분주하고 배양액 내에 여러 농도(0.03 µg/ml, 3 µg/ml, 300 µg/ml)의 범랑기질단백질유도체를 처리 후 19일 후에 석회화 결절의 형성을

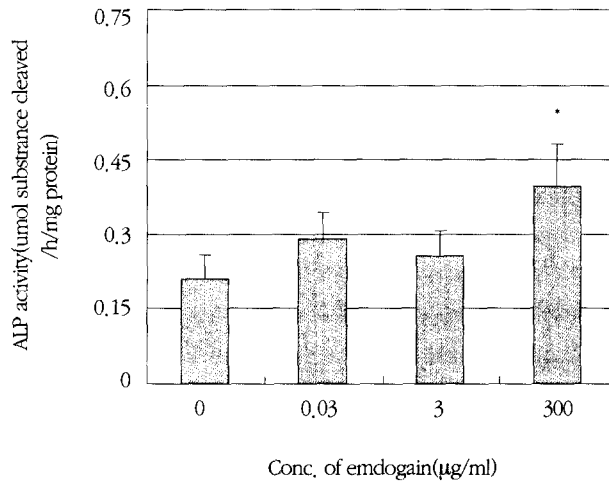


Figure 7, Effect of Emdogain on ALP activity of PDL cells for 48 hours, Data represent mean \pm S.E. of 5 replicates
*:Significantly different from corresponding control(p < 0.05)

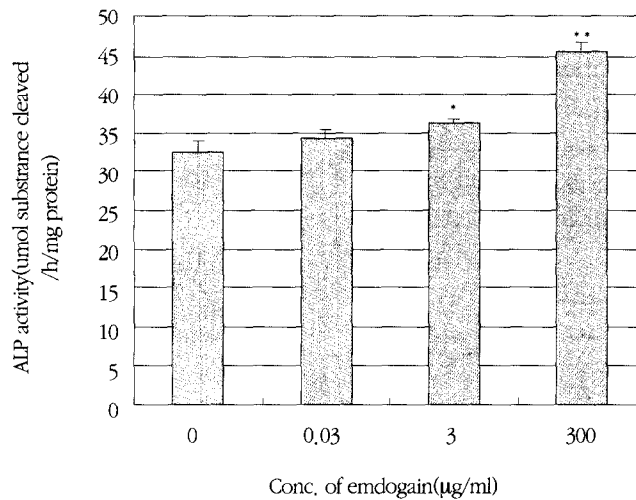


Figure 8, Effect of Emdogain on ALP activity of ROS17/2.8 cells for 48 hours.
Data represent mean \pm S.E. of 5 replicates
*:Significantly different from corresponding control(p < 0.05)
**: Significantly different from corresponding control(p < 0.01)

관찰한 경우 0.03 μ g/ml, 3 μ g/ml의 농도군에서 별 차이가 관찰되지 않았으나, 300 μ g/ml의 농도군에서는 석회화 결절 형성이 증가됨을 볼 수 있었다(Figure 16, 17).

MG63 세포에 여러 농도(0.03 μ g/ml, 3 μ g/ml, 300 μ g

/ml)의 범랑기질단백질유도체를 처리한 후 19일 후에 광학현미경으로 관찰한 군의 경우는 농도 증가에 따라 결절 형성의 양상이 까맣게 증가되고 있음을 볼 수 있었으며 특히 300 μ g/ml의 범랑기질단백질유도체 군에서 결절 형성이 잘 일어나고 있는 모습을

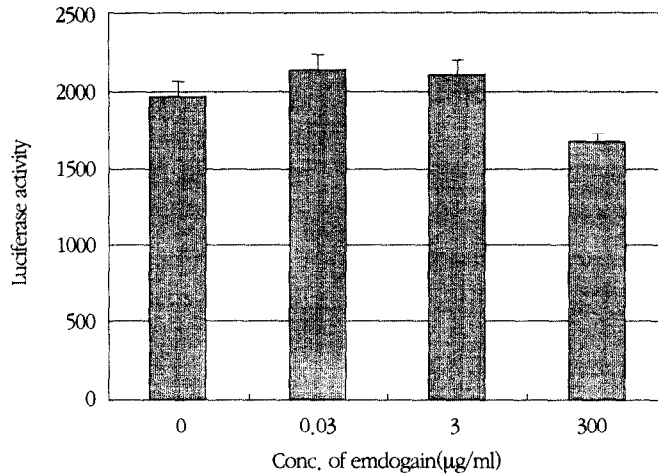


Figure 9. Effect of Emdogain on the expression of Luciferase in the stable p6xOSE2-Luc-transfected C2C12 cells for 24 hours

관찰할 수 있었다(Figure 18, 19).

IV. 총괄 및 고찰

골조직의 재생에 사용되는 이식재에 대한 조골세포의 부착은 세포의 성장 이주 및 분화의 기본적인 과정으로 이루어지며 골조직과 이식재 사이의 계면 형성은 조골세포와 이식재의 적절한 상호작용에 영향을 받는다. 그러므로 조골세포의 부착은 골조직과 이식재의 상호작용에 필수적 요소이다. 이식재중 하나인 합성골 대체물은 골형성의 골격으로 작용하며 잔존 이식 대체물 없이 새로운 신생골로 대체되기 위해서 비교적 빠른 흡수성을 가져야 하며 생체 재료의 생리화학적 표면 특성이 세포와의 상호작용에 커다란 영향을 준다고 알려져 있다²⁸⁻³³).

따라서 조골세포의 초기 부착을 증가시키는데 법랑기질 단백질 유도체가 영향을 끼치며 이러한 법랑기질 단백질 유도체를 이식재와 같이 적용하여 치주병소의 골 결손부를 회복할 경우 조골세포의 부착을 증진시키고 활성화 시켜^{14,19}) 치주조직 재생에 기여할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 실험에 적합한 법랑기질 단백질 유도체의 농도를 정하기 위해서 MG63 세포의 생존율

에 미치는 영향을 관찰하였는데 이는 실험에 사용되는 세포의 생존 여부가 세포의 부착도, 증식, 활성도를 측정하는데 필수적이기 때문이며 이 결과 법랑기질 단백질 유도체가 여러 농도에서 MG63 세포의 생존율을 유의성 있게 증가시켰다. 1000 μg/ml 이상의 농도는 배지에 적용시키는 것이 어려우며 또한 세포 배양이 힘들기 때문에 3000 μg/ml (3mg/ml)까지의 법랑기질 단백질 유도체의 농도를 실험해 보았으며 이중 0.03 μg/ml, 3 μg/ml, 300 μg/ml의 농도를 본 실험에 사용하였다. 법랑기질 단백질 유도체는 소수성 단백질로 구성되어 있어 배지등에 용해시 녹지 않고 배양접시에 침전되는 양상을 보여 단백질 피막과 비슷한 단백질 층을 이루게 된다.

법랑기질 단백질 유도체를 실험적으로 야기된 골 내병소에 사용한 연구³⁴⁾나 사람의 치주조직의 골내 결손부의 치료에 사용한 연구³⁵⁾도 있어왔다. 그러나 지금까지는 발표된 과학적인 연구가 양적으로도 부족했으며, 철저하게 증거를 토대로 한 분석도 미미하였다. 따라서 앞으로 지속적인 과학적, 임상적 확인이 필요한 상황이다.

본 연구에서는 법랑기질 단백질 유도체가 치주인대 세포와 조골세포를 활성화 시키고 부착도를 증진시키며 또한 염기성 인산분해효소를 활성화시킴을

관찰하였다. 이는 임상가들이 효과적인 골내 결손 치료법을 위하여 법랑기질 단백질 유도체를 선택할 수 있는 생화학적인 증거가 될 수 있을 것이다.

법랑기질 단백질 유도체를 이용한 치주재생술식은 치아 발생 초기에 대한 우리의 이해가 증진됨으로써 가능하였다.²³⁾ 치근 발생의 어느 단계에서 헤르트리그 상피근초(Hertwig's epithelial root sheath)의 세포가 분비하는 법랑기질 단백질 유도체는 무세포성 치근백악질 형성에 있어서 필수적인 요소이다. 또한 이는 치주인대와 치조골 형성의 선행조건이 된다. 임상적으로 법랑기질 단백질 유도체를 사용하면 치주조직의 발생과정과 유사한 상황을 만들 수 있게 된다.

조골양세포의 부착량 측정에서 배지에 각 농도로 법랑기질단백질유도체를 처리 후 MG63 세포와 치주인대양세포가 부착되는 것을 1, 4, 8시간 경과 후 광학현미경하에서 관찰하여 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 법랑기질단백질유도체 농도에서 부착이 많이 일어남을 보았다. 이때 부착량을 통계 처리하는데 어려움이 있었는데 이는 부착된 조골양세포들 대부분이 엉겨 붙어 계수하는 것이 힘들었기 때문이며 같은 배율로 측정된 사진상의 조골양세포 면적을 비교하는 방법도 있으나 이 역시 세포들이 겹쳐져 있는 경우가 많아 정확하지 않다는 단점이 있다. 따라서 부착된 세포들을 계수하기 위해 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 배양 접시에 부착된 세포들을 원심분리하여 광학현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 계수하였다.

법랑기질 단백질 유도체는 동물과 인간 모두에서 신부착의 형성을 증진시키는 것으로 알려져 있으며^{23,27,34)} 법랑기질 단백질 유도체의 처리 후에 형성되는 백악질은 무세포성이며, 치근에 항상 견고하게 부착하는 것으로 보고 되고 있다.^{27,34)} 본 실험에서의 MG63 세포와 치주인대양세포의 부착도 측정에서도 법랑기질단백질유도체에 의해 조골세포 형질을 갖고 있는 MG63 세포와 ROS17/2.8세포 및 치주인대양세포의 부착이 증가된 것도 이와 같은 연구들의 결과와 유사한 양상을 나타내었다.

세포부착도 측정을 위해 배양액내에 법랑기질단백질유도체를 각 농도로 처리하고 ROS17/2.8 세포

의 부착도를 시간 경과에 따른 세포수 증가 분포로 관찰하여 보니 법랑기질단백질유도체 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 시간대별로 부착세포수가 증가하였다. 그러나 같은 조골세포주인 MG63 세포에서 법랑기질 단백질 유도체 적용시 MG63 세포의 수는 감소되고 염기성 인산분해효소와 osteocalcin 생성은 증가시킴을 보고한 Schwartz 등³⁶⁾의 연구와는 상반된 결과를 나타내었다. 하지만 염기성 인산분해효소는 증가시키며 부착 세포수는 감소하는 반대적 관계에 일정한 규칙은 존재하지 않는다고 Lian 등³⁷⁾은 보고한 바 있으며 법랑기질 단백질 유도체 적용시에 부착되는 조골세포수의 증가는 세포 특이적인 현상으로 사료되며, 따라서 법랑기질 단백질 유도체가 MG63 세포의 부착도에 미치는 영향에 대해서는 더 많은 연구가 이루어져야 된다고 생각된다.

ROS17/2.8 세포의 부착도 측정에서 배양액내 10% FBS(fetal bovine serum)을 첨가한 경우에는 60분과 120분 경과시에 부착세포수의 증가를 보였으나 240분 경과시는 법랑기질단백질유도체의 각 농도에 따른 부착세포수가 감소하거나 유의한 차이를 보이지 못하였다. 이는 법랑기질단백질유도체가 ROS17/2.8 세포의 초기부착에 더 많은 영향을 끼치는 것으로 사료된다.

Kuru 등³⁸⁾은 치주조직의 재생시 기능적으로 잘 배열된 치주인대세포의 배열과 더불어 신생골 형성이 잘 이루어짐을 볼 수 있는데 이는 치주인대 세포의 fibronectin 과 같은 세포의 단백질의 생산과 관련이 있으며 치주인대세포에는 치은섬유아세포보다 fibronectin의 양이 풍부하여 보다 빠른 세포부착을 일으킨다고 보고한 바 있으며 이에 본 실험에서의 법랑기질 단백질 유도체 적용에 따른 치주인대양세포의 부착도 증가는 치주조직의 재생에 있어 중요한 역할을 할 것이라고 사료된다.

성장인자 중 TGF β -1은 창상 치유에 중요한 역할을 하며³⁹⁾ integrin의 발현에 조절인자로 작용하여⁴⁰⁾ 치주인대세포의 치유와 재생에 중요한 인자로 작용한다고 한다⁴¹⁾. 법랑기질 단백질 유도체 적용시 치주인대 세포에 의한 TGF β -1의 생성을 유도한다는 Lyngstadaas의 연구⁴²⁾에서 볼 수 있듯이 법랑기질 단

백질 유도체는 치주인대세포의 부착, 재생 등에 중요한 인자로 작용한다고 할 수 있다.

세포 증식도 측정에서 범랑기질단백질유도체 적용시 치주인대양세포와 MG63 세포의 증식이 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었는데 이는 범랑기질단백질유도체가 치주인대양세포와 MG63 세포의 대사를 증진시켜 증식이 일어났다고 사료되며 이는 치주인대세포의 경우에서 볼 때 치주인대세포에 범랑기질단백질유도체 적용시 TGF- β 1, IL-6, PDGF AB 등의 증식을 촉진시키며 세포내 cAMP의 증가를 가져와 치주인대세포의 부착 및 대사성장을 가져온다고 보고한 Lyngstadaas 등⁴³⁾의 연구 결과와 비슷한 양상을 보인다고 할 수 있다. 그러나 Petinaki 등은 범랑기질 단백질 유도체가 면역체계에 미치는 영향에 대한 연구에서 제한적으로 CD4 T-lymphocyte 등에만 자극을 일으킨다고 보고한 결과도 있었다⁴⁴⁾.

조골세포의 활성도를 측정하는 데는 osteocalcin, procollagen I, carboxyl terminal extension peptide 및 염기성 인산분해 효소 활성도 등이 사용되는데⁴⁵⁾ 본 연구에서는 주로 세포막에 결합되어 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내고⁴⁶⁾, 유기인산 에스테르를 가수분해하여 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 세포기질에 calcium phosphate 침착을 유도하며⁴⁷⁻⁴⁸⁾, 세포분열이나 분화의 조절자로서의 역할을 하는 염기성인산분해 효소를 측정하였다.

조골세포주인 ROS17/2.8 세포와 치주인대양세포를 배양하고 범랑기질단백질유도체를 처리 후 염기성인산분해 효소의 활성을 측정하였는데 염기성 인산분해 효소의 측정은 Boyan 등의 연구에서와 같이 pH 10.2에서 p-nitrophenylphosphate에서 p-nitrophenol의 방출을 측정함으로써 이루어졌고⁴⁹⁻⁵⁰⁾ 치주인대양세포의 경우 300 μ g/ml의 범랑기질단백질유도체 농도에서 염기성 인산분해효소 활성도가 유의성 있게 높게 나타났으나 치주인대세포는 세포 특성상 세포기저 활성도가 낮아서 전반적으로 염기성 인산분해 효소 활성량이 적게 나타남을 관찰할 수 있었다.

MG63 세포도 세포기저 활성도가 매우 낮아 실험

에 사용키 어려워 ROS17/2.8 세포를 사용하였는데 3 μ g/ml, 300 μ g/ml의 범랑기질단백질유도체 농도에서 염기성 인산분해효소의 활성이 높게 나타남을 관찰하였다.

Monique 등⁵¹⁾의 연구에서는 치주인대세포와 치은섬유아세포에 범랑기질 단백질 유도체의 처리시, 농도에 따른 염기성 인산분해효소의 활성도를 측정하였는데, 치주인대 세포의 경우는 100 μ g/ml의 농도까지 농도 의존적으로 염기성 인산분해 효소의 활성도가 증가하였으며 TGF β 1의 양도 증가함을 보고하였으나 본 실험에서는 300 μ g/ml의 농도에 이르러 유의성 있게 염기성 인산분해효소 활성도가 증가함을 볼 수 있었다. 이는 세포 특성상 기저 활성도가 낮기 때문에 활성량이 적게 나타난 것이라 사료된다.

또한 치은섬유아세포 보다 결체 조직이나 치주인대세포에 효소가 풍부하기 때문에 염기성 인산분해효소의 활성이 더 잘 일어난다는 보고⁵²⁻⁵⁴⁾에서 볼 수 있듯이 3 μ g/ml의 범랑기질단백질유도체 농도까지는 대조군과 실험군 간에 염기성 인산분해효소의 활성 차이가 유의성 있게 나타나지 않음을 확인하였다.

석회화결절 형성의 측정에서 조골양세포와 치주인대양세포 분주 후 범랑기질단백질유도체를 각 농도로 처리하고 19일 후 3.7% formalin으로 세포를 고정하고 3% silver nitrate 용액을 반응시켰는데 이는 silver nitrate 용액이 칼슘이온을 침착시켜 석회화결절 형성이 가시광선에서 칼슘이온 부분을 까맣게 관찰할 수 있기 때문이다. 관찰 결과 치주인대양세포와 MG63 세포에서 범랑기질단백질유도체 300 μ g/ml의 농도에서 결절 형성이 증가됨을 보았는데 이는 Sculean 등⁵⁵⁾이 범랑기질 단백질 유도체 처리시 임상적 부착 증진뿐만 아니라 방사선 사진 상의 경조직 증가도 관찰할 수 있었다고 한 연구와 다르지 않음을 확인할 수 있었다.

최근에 Zetterstrom 등⁵⁶⁾은 치주조직의 재생에 있어 범랑기질 단백질 유도체 사용의 안전성에 대해 언급한 바 있다. 치주조직의 재생에 있어서는 새로운 백악질과 치주인대 세포, 골조직의 형성이 필요하다.²⁷⁾ 따라서 범랑기질 단백질 유도체가 조골세포와 치주인대 세포의 부착을 증가시키고 활성화 시키는

것은 임상적 사용에 뒷받침되는 연구가 된다고 사료되었다.

본 연구의 결과 법랑기질 단백질 유도체가 조골양 세포와 치주인대양세포의 세포 부착을 증가시키고 염기성 인산분해효소의 활성 및 석회화 결절형성에 관여하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 임상적으로 골내 치주결손부의 치료에 있어서 의미 있는 부착수준 증가와 방사선허복 골 증가를 얻을 수 있다고 사료되며 이러한 결과를 바탕으로 신부착 과정에서의 법랑기질 단백질 유도체의 효능을 조사하는 더 많은 연구가 있어야 될 것이며 법랑기질 단백질 유도체를 이용하여 얻을 수 있는 재생치주조직의 질과 양을 평가하고, 또한 다른 치주재생술식의 효과와 비교하기 위해서는 앞으로 더 많은 조직학적, 생화학적 연구가 추가적으로 시행되어야 할 것이다.

V. 결론

법랑기질단백질유도체가 세포수준에서 조골세포 및 치주인대 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조골세포주인 MG63 세포와 ROS17/2.8 세포 및 치주인대양세포를 사용하여 농도별로 법랑기질단백질 유도체가 피막된 배양접시에서 각각의 세포 부착도를 측정하였으며 세포 증식도, 염기성 인산분해효소 활성 및 골형성 촉진인자 활성, 석회화 결절 형성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 법랑기질 단백질 유도체에 의해 조골양세포와 치주인대양세포 모두 초기 세포부착이 증가되었다.
2. 300 μ g/ml의 법랑기질 단백질 유도체 농도에서 조골양세포와 치주인대양세포의 세포 증식이 촉진되었다.
3. 법랑기질 단백질 유도체의 농도가 증가함에 따라 조골양세포의 염기성 인산분해효소 활성이 증가되었으며, 치주인대양세포의 경우 300 μ g/ml의 농도의 법랑기질 단백질 유도체가 염기성 인산분해효소 활성을 증가시켰다.
4. 실험에 사용한 모든 농도의 법랑기질 단백질 유도체에서 조골양세포의 분화를 위한 전사인자 (Runx2)의 통계적으로 유의한 활성변화는 관찰되지 않았다.
5. 300 μ g/ml의 농도에서 조골양세포의 석회화결절 형성이 다른 농도에 비해 현저히 증가되었다.

이상의 연구 결과를 토대로 볼 때 법랑기질 단백질 유도체가 조골양세포 및 치주인대양세포의 초기 부착, 증식 및 활성을 촉진시키며, 전사인자의 활성에는 영향을 미치지 못함을 관찰하였으며 따라서 법랑기질 단백질 유도체가 초기 치주조직 재생 및 신부착에 유효한 효과가 있음을 알 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Polson AH.: The root surface and regeneration : Present therapeutic limitations and future biologic potentials, J Clin Periodontol 1986; 13: 955-996.
2. Stahh SS.: Repair potential of the soft tissue root interface, J Periodontol 1977; 48: 545-552.
3. Karring J, Nymann S, Lindhe J and Sirirat M. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into bone tissue, J Clin Periodontol 1980; 7: 96-105.
4. Nyman S, Karing J, Lindhe J and Platen S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gigital connective tissue J Clin Periodontol 1980; 7: 394-401.
5. Andreasen JO. : Periodontal healing after replantation and autotransplantation of permanent incisors, Int J Oral Surg 1981; 60: 54-61.
6. Karring J, Nymann S, Lindhe J, Sirirat M. : Potentials for root resorption during periodontal wound healing, J Clin Periodontol 1984; 11: 41-52.
7. 최형호, 김정근, 임성빈, 정진형 : PDGF가 조골세포의 활성에 미치는 영향. 대한치주과 학회지 1999; 29: 4: 785-802.

8. 박상일, 정진형, 임성빈, 김정근 : 혈소판 농축혈장이 조골세포의 초기부착과 증식 및 활성화에 미치는 생물학적 영향. 대한치주과학회지 2001; 31: 3: 513-529.
9. Rutherford RB, Trilsmith MD, Ryan HE and Charette MF. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factors mitogenesis in vitro. Arch Oral Biol 1992; 37: 139-145.
10. Giannobile WV, Finkelman RD and Lynch SE. : Comparison of canine and non-human primate animals models for periodontal regenerative therapy : Results following a single administration of PDGF/IGF-I. J periodontol 1994; 65: 1158-1168.
11. Lynch SE, Colvin RV and Antoriades HN. : Growth factors in wound healing : Single and synergistic effects on the partial thickness porcine skin wounds. J Clin Invest 1989; 84: 640-646.
12. Peter Eickholz. : Long term result of guided tissue regeneration therapy with nonresorbable and bioabsorbable barrier. J Periodontol 2001; 72: 35-42.
13. Carlos Rossa Jr. : Regeneration of class II furcation defects with b-FGF associated with CT. J Periodontol 2000; 71: 775-784.
14. Gunnar Henden. : Treatment of human periodontal infrabony defects with Emdogain. Case report: Clinical and radiographic examination after one year of treatment. Int J Periodontics Restorative Dent 2000; 1: 19-31.
15. Giulio Rasperini, Giano R, Maurizio S. : Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery. Int J Periodontics Restorative Dent 2000; 1: 59-67.
16. Stuart J. Froum. : A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defect. J Periodontol 2001; 72: 25-34.
17. Anton Sculean. : The effect of postsurgical antibiotics on the healing of intrabony defect following treatment with enamel matrix protein. J Periodontol 2001; 72: 190-195.
18. 백승호, 손호현, 임성삼 : 성견에서 Super EVA, Ketac silver, MTA와 Emdogain을 이용한 치근분지부 천공치유에 관한 연구. 대한치과보존학회지 2000; 25: 2: 159-165.
19. Anton Sculean, Giovanni C, Peter W, Nicolaos D. : Enamel matrix derivative(Emdogain) for human periodontal reconstructive surgery: clinical and histologic evaluation. Int J Periodontics Restorative Dent 2001; 2: 49-55.
20. Raymond A, Yukna. : Histologic evaluation of periodontal healing in humans following regenerative therapy with enamel matrix derivative. J Periodontol 2000; 71: 752-759.
21. Mellonig JT. : Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: Technique, clinical and histologic case report. Int J Periodontics Restorative Dent 1999; 19: 8-19.
22. Sculean A, Donos N, Blaes A, Reich E, Brex M. : Enamel matrix proteins(Emdogain) and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony periodontal defects: A split-mouth clinical study. J Dent Res 1998; 77: 924-929.
23. Hammarstrom L. : Enamel matrix cementum development and regeneration. J Clin Periodontol 1997; 24: 658-668.
24. Sigurdsson TJ, Hardwick R, Bogle GC, Wikesjö UME. : Periodontal repair in dogs : space provision by reinforced e-PTFE membranes enhance bone and cementum regeneration in large supraalveolar defects. J Periodontol 1994; 65: 350.
25. Beertsen W, Van den Bos T, Everts V. : Root development in mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase gene. Inhibition of acellular cementum formation. J Dent Res 1999; 78:

- 1221-1229.
26. Desalu AB. : Correlation of localization of alkaline and acid phosphatases with morphological development of the rat kidney. *Anat Rec* 1966; 154:253-259.
 27. Heijl L. : Peridontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 693-696.
 28. Radin S, Ducheyne P. : The effect of calcium phosphate composition and structure on in vitro behavior II. Precipitation. : *J Biomed Mat Res* 1993; 27: 35-44.
 29. Radin S, Ducheyne P. : Kinetics of the in vitro surface transformation of bioactive ceramics to biologically equivalent apatite. In: Ducheyne P, Christiansen D, editor. *Bioceramics 6*. Oxford: Butterworth-Heinemann 1993. p59-65.
 30. Kokubo T. : Analysis of ceramic-tissue interface reaction. In: Ducheyne P, Christiansen D, editors. *Bioceramics 6*. Oxford: Butterworth-Heinemann 1993. p73-78.
 31. Le Geros RG, Orly I, Gregoire M and Daculsi G. : Substrate surface dissolution and interfacial biological mineralization. In: Davies JE, editor. *The bone-biomaterial interface*. Toronto : Univ Toronto Press 1991; p76-78.
 32. Kokubo T, Ito S, Huang T, Hayashi T, Sakka S, Kitugi S and Yamumara T. : Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mat Res* 1990; 25: 331-343.
 33. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitugi S and Yamumara T. : Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mat Res* 1990; 24: 721-734.
 34. Hammarström L, Heijl L, Genstrelus S. : Peridontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 669-677.
 35. Heijl L, Heden G, svärdstrom G, Ötgren A. : Enamel matrix derivative (Emdogain) in the treatment of infrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 705-714.
 36. Schwartz Z, Carnes DL, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, Cochran DL and Boyan BD. : Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol* 2000; 71: 1287-1296.
 37. Lian JB, Stein GS. : Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; 3: 269-305.
 38. Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I. : Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1998; 77: 555-564.
 39. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. : The cell biology of transforming growth factor- β *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032: 79-87.
 40. Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. : Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β concomitant regulation of integrins that share a common β 1 subunit. *J Biol Chem* 1989; 264: 380-388.
 41. Ripamonti U, Reddi AH. : Tissue engineering, morphogenesis and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 154-163.
 42. Lyngstadass SP, Ekdahl H, Lundberg E, Andersson C, Genstrelus S. : Increased TGF- β 1 production in PDL cells grown on Emdogain matrix. *J Dent Res* 1999; 78(Spec. Issue):

- 189(Abstr,671).
43. Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. : Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 181-188.
 44. Petinaki E, Nikolopoulos S, Lastanas E.: Low stimulation of peripheral lymphocytes, following in vitro application of Emdogain. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 715-720.
 45. Aufmkolk B, Huashcka PV and Schwartz ER.: Characterization of human bone cell in culture. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 228-235.
 46. Anderson HC.: Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989; 60: 320-330.
 47. Beertsen W, Theo Van Bos.: Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. *Matrix* 1989; 9: 159-171.
 48. Bellows CG, Aubin JE and Heersche JNM.: Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* 1991; 14: 27-40.
 49. Boyan BD, Schwartz Z, Bonewald LF, Swain LD.: Localization of 1,25-(OH)₂D₃ responsive alkaline phosphatase in osteoblast-like cells (ROS17/2.8, MG63, and MC3T3) and growth cartilage cells in culture. *J Biol Chem* 1989; 264: 11879-11886.
 50. Bretaudiere JP, Spillman T.: Alkaline phosphatases. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, 4th ed. Weinheim, Germany: Verlag Chemica; 1984; p75-92.
 51. Monique T, Van der Pauw, Theo Van den Bos, Vincent Everts and Wouter Beertsen. : Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor β 1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2000; 71: 31-43.
 52. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA.: A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988; 67: 66-70.
 53. Piche JE, Carnes DL, Graves DT.: Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 1989; 68: 761-767.
 54. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W.: Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: Its relation to cementum formation. *J Dent Res* 1995; 74: 1374-1381.
 55. Sculean A, Reich E, Chiantella GC, Brex M. : Treatment of infrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative(Emdogain): A report of 32 cases. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999; 19: 157-163.
 56. Zetterstrom D, Andersson C, Eriksson L. : Clinical safety of enamel matrix derivative(Emdogain) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 697-704.

사진부도 설명

- Figure 10. Attached MG63 cell for 1 hour on Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 100$)
- Figure 11. Attached MG63 cell for 4 hour on Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 100$)
- Figure 12. Attached MG63 cell for 8 hour on Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 100$)
- Figure 13. Attached PDL cell for 1 hour on Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 100$)
- Figure 14. Attached PDL cell for 4 hour on Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 100$)
- Figure 15. Attached PDL cell for 8 hour on Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 100$)
- Figure 16. Calcified nodule formation on PDL cell culture treated with Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 100$)
- Figure 17. Calcified nodule formation on PDL cell culture treated with Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 12.5$)
- Figure 18. Calcified nodule formation on MG63 cell culture treated with Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 100$)
- Figure 19. Calcified nodule formation on MG63 cell culture treated with Emdogain group(b : $0.03\mu\text{g/ml}$, c : $3\mu\text{g/ml}$, d : $300\mu\text{g/ml}$) and control group(a) (Toluidine blue, $\times 12.5$)

사진부도 (I)

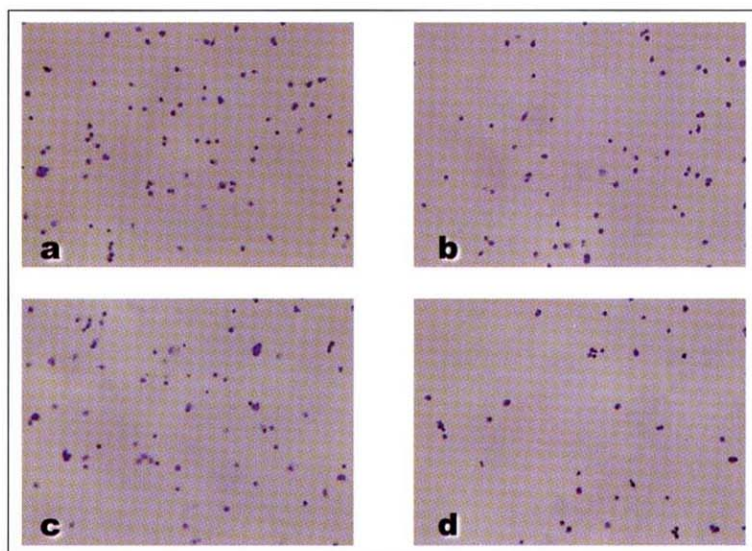


Figure 10

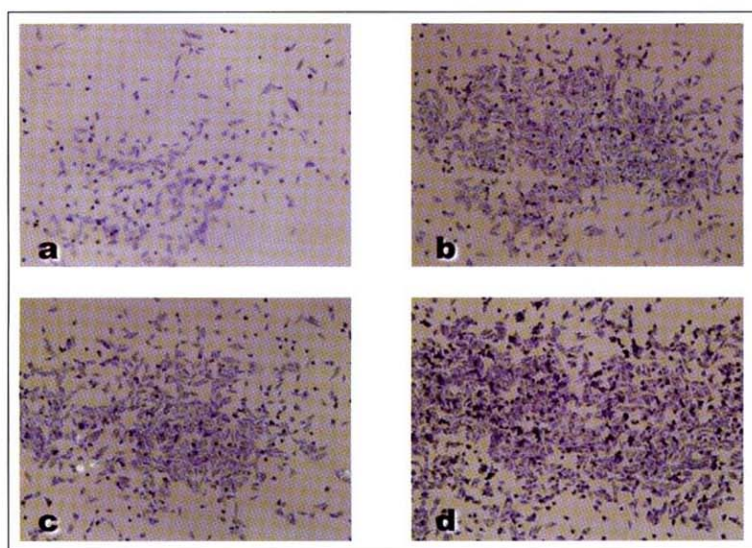


Figure 11

사진부도 (Ⅱ)

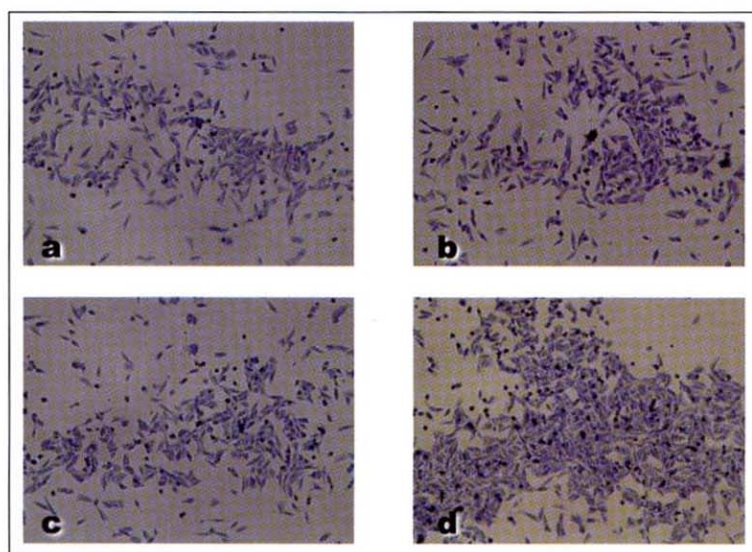


Figure 12

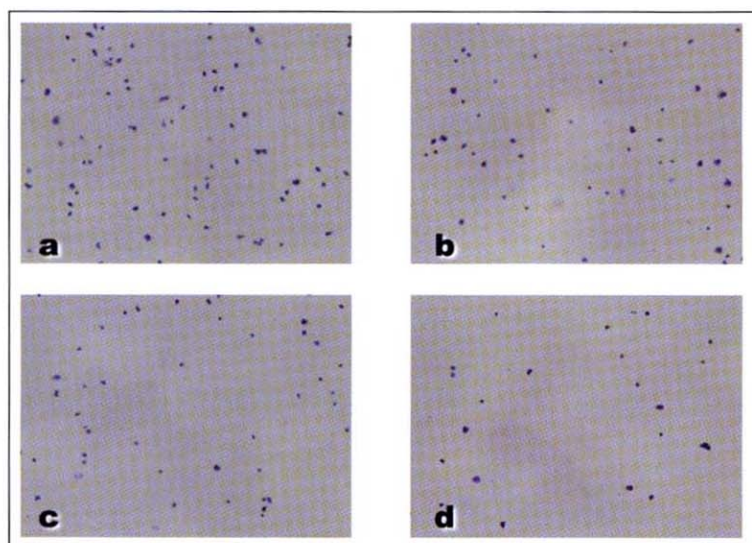


Figure 13

사진부도 (Ⅲ)

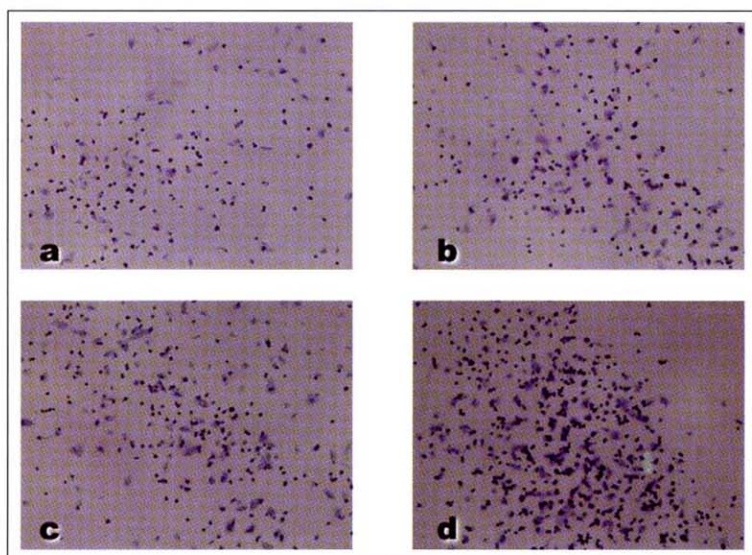


Figure 14

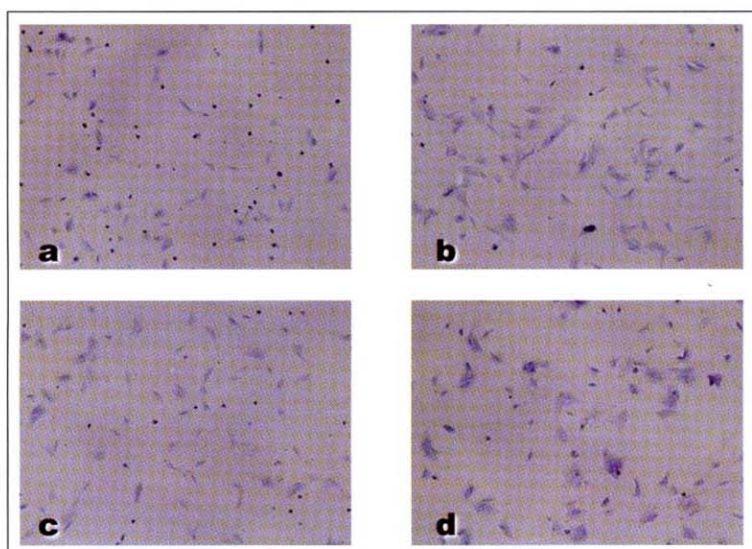


Figure 15

사진부도 (Ⅳ)

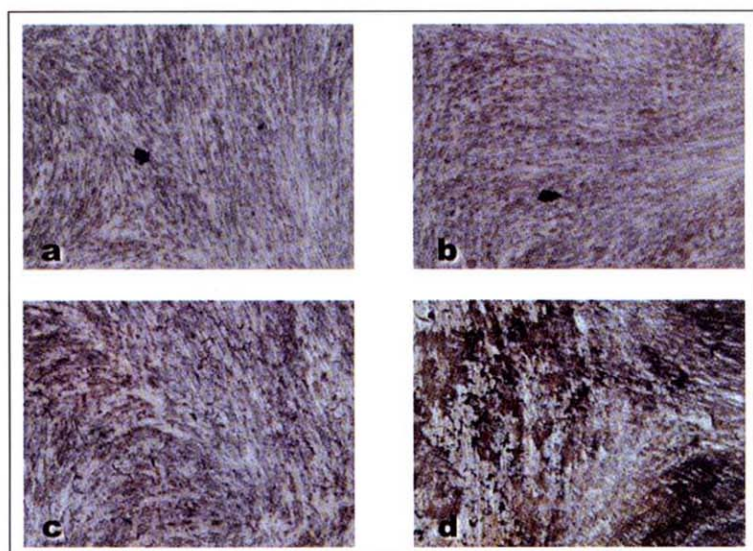


Figure 16

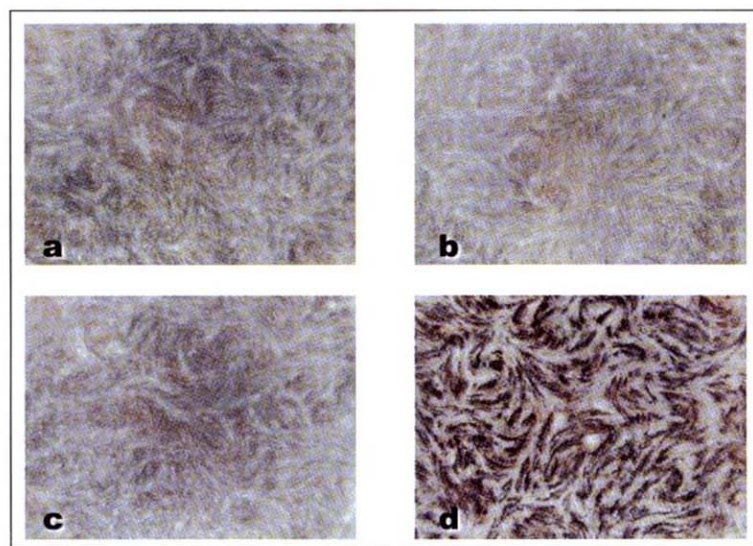


Figure 17

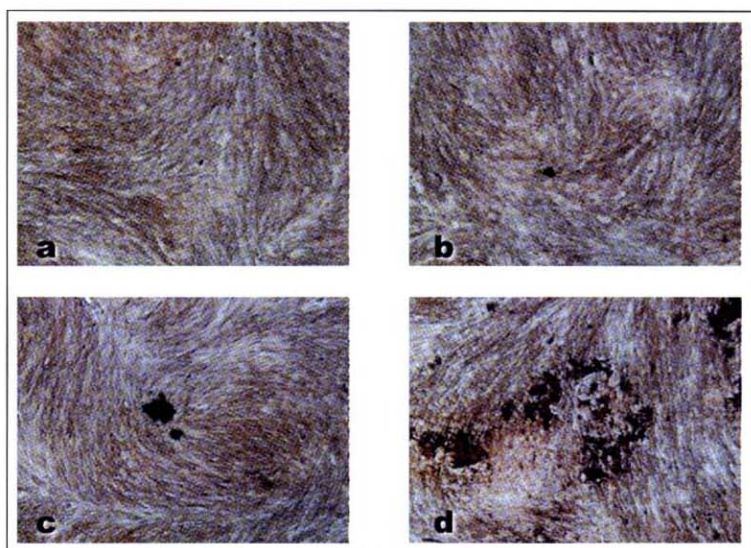


Figure 18

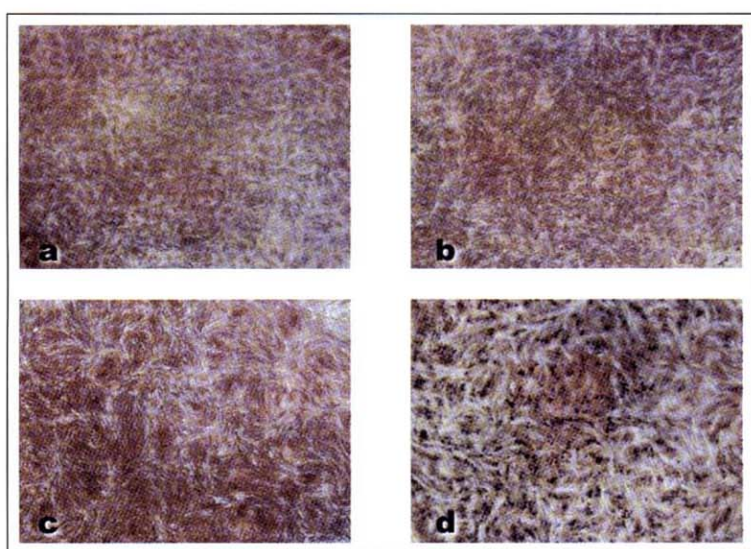


Figure 19

Effects of enamel matrix protein derivatives on the periodontal ligament like fibroblast and osteoblast like cells

Dong-Woon Kim¹, Chin-Hyung Chung¹, Sung-Bin Lim¹, Seon-Yle Ko²

¹Department of Periodontology, College of Dentistry, Dankook University

²Department of Biochemistry, College of Dentistry, Dankook University

Recent study on the enamel matrix derivatives explained on the effects of new bone and new attachment formation in infrabony pocket of periodontal defects.

The purpose of this study was to investigate on the biological effects of enamel matrix derivatives to attachment, proliferation and activation of periodontal ligament and osteoblast cells.

After treatment of osteoblast and PDL cells with various Emdogain concentration level (0.03 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$), activation of osteogenetic factor, calcified nodule formation and measuring alkaline phosphatase activity (ALP) were performed.

1. Both osteoblast and PDL cell showed increasing initial cell attachment with 300 $\mu\text{g/ml}$ Emdogain concentration.
2. At the level of 300 $\mu\text{g/ml}$, accelerated proliferation of osteoblast and PDL cell was appeared.
3. As Emdogain's concentration increased, increased ALP activation of osteoblast was shown. In case of PDL cell, Emdogain increased ALP activation prominently at the level of 300 $\mu\text{g/ml}$.
4. No statistically significant activating change were founded at all of the concentrations of Emdogain on the activating of transcript factor Runx2 for differentiating osteoblast.
5. At the level of 300 $\mu\text{g/ml}$, calcified nodule formation was increased prominently to compare with other concentration.

These results indicated that Emdogain should activate initial attachment, proliferation and activation, but not on Runx2 activation and can be used for useful tool of the treatment of periodontal tissue regeneration.

Key word : enamel matrix derivatives, Emdogain, periodontal tissue regeneration