

Enamel Matrix Derivatives가 사람 치주인대 세포의 특이유전자인 PDLs17, PDLs22의 발현에 미치는 효과

한근아¹ · 장현선¹ · 국중기² · 박주철³ · 김흥중⁴ · 김종관⁵ · 김병욱¹

조선대학교 치과대학 치주과학 교실¹, 조선대학교 치과대학 생화학 교실²,
조선대학교 치과대학 구강조직 발생학 교실³, 조선대학교 치과대학 해부학 교실⁴,
연세대학교 치과대학 치주과학 교실⁵

I. 서론

치주 질환은 염증과 동반하여 백악질, 치주인대, 그리고 골을 포함하는 지지조직의 상실이 일어난 것으로 특징 지워지며 치주 치료의 최종 목적은 진행되는 치주 질환의 증상을 제거하는 것 뿐만 아니라 이미 파괴된 지지조직을 기능적으로 재생시키는데 있다. 치주조직의 재생을 위해서는 감염성, 염증성 질환에 이환된 치근면위에 신생 백악질의 침착, 신생 골의 형성과 함께 새로운 치주인대 섬유 조직의 기능적인 삽입, 배열, 그리고 치은 조직의 구조화가 필요하다. 치주조직 재생 유도 물질의 개발을 위해서는 먼저 치아를 지지하며 백악질과 치조골을 형성할 뿐만 아니라 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 치주인대 세포의 발생과 분화와 관련된 독특한 분자 생물학적 기전을 이해하는 것이 필수적이다. 치주인대는 두 개의 석회화 조직인 골과 백악질 사이에 위치하는 치밀결합조직으로, 치아를 유지시켜주고 경조직의 구조적 특성을 유지시키는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 생체내에서의 인접 치조골 및 백악질의 수복과 재생에도 관여하는 것으로 알려져 있다

¹⁾ Nyman 등²⁾은 골 결손 부위에 상피세포와 잇몸 결합조직에서 유래되는 세포의 침투를 막고 치주인대 세포만의 증식을 허용하는 방법으로 차단막을 이용한 조직유도재생술을 통하여 결합조직의 부착과 함께 신생 백악질의 형성을 관찰하였으며, 또한 치주인대 세포에 ascorbic acid, β -glycerophosphate, dexamethasone을 첨가한 조건배지에서 골이나 백악질과 유사한 석회화 결절이 형성되었다는 여러 실험 결과가 보고되고 있다³⁾. 골과 백악질 형성에 있어 치주인대 세포의 분화와 관련된 인자들로 Platelet-derived growth factor(PDGF), Transforming growth factor- β (TGF- β), Fibroblast growth factor(FGF), Parathyroid hormone-related protein(PTH-RP)와 Bone morphogenetic protein(BMP)가 강력하게 제시되고 있으나^{4,5)}, 이들은 경조직 형성에 전반적으로 관여하는 인자들로 생각할 수 있으며 치주인대 세포의 분화에 선택적으로 관여한다고는 볼 수 없다.

최근에 Park 등⁶⁾은 치주조직의 재생을 유도할 수 있는 분화유도인자에 관한 연구에서 일반 결합조직의 섬유모세포인 치은 섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포에서 선택적으로 발현되는 유전자가

*This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (03-PJ1-PG1-CH08-0001).

교신저자: 김병욱 광주광역시 동구 서석동 421번지 조선대학교 치과대학 치주과학 교실, 우편번호 501-759, bobkim@chosun.ac.kr

치주인대의 발생과 분화에 중요한 역할을 할 수 있다는 가설을 바탕으로 배양 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포 사이의 유전자들을 subtraction 방법으로 비교하여 치주인대 섬유모세포-특이 유전자;PDLs5, 17, 22, 25, 31을 검출하였고, 그 중 PDLs17과 PDLs22의 면역조직화학염색에서 생쥐와 쥐의 치주조직 분화과정에서 PDLs17과 PDLs22 단백질이 치주조직에 선택적으로 발현됨을 보고하였다. Database와 RACE 그리고 염기서열 분석을 통하여 PDLs17과 PDLs22의 염기서열을 분석하고 추정 단백질 서열을 분석한 결과 PDLs17은 26 kd의 새로운 세포질 내 단백질이며 PDLs22는 27 kd의 새로운 세포외와 세포내 부위를 갖는 세포질 내 단백질로 밝혀졌으며, 특히 PDLs22는 치아 발생과정에서 초기 백악모세포와 골모세포 전구세포(preosteoblast) 그리고 치주인대 섬유모세포에서 발현되어 치주조직 전체의 분화와 재생에 관여하는 인자로 간주할 수 있다⁹⁾.

예전부터 치주조직 재생을 위해 다양한 방법의 수술이 행해져 왔으나, 1970년대가 되면서 골 결손부에 대한 자가골, 인공골의 이식과 같이 기존의 치주조직의 재생을 의도하여 행해졌던 치주외과 방법으로는 신부착이 획득되지 않는다는 것이 조직학적으로 실증되었다¹⁰⁾. 1976년에 치주조직의 재생과 새로운 부착은 건강한 치주인대로부터의 미분화 간엽세포에 의한다는 개념이 발표된 후¹¹⁾, 1980년대에 들어서면서 치주외과 부위에서 치주조직 세포의 재생 속도를 조절할 목적으로 판막 하방에 막을 넣는 방법을 이용하는 조직유도 재생술이 시행되었으나¹²⁾, 이들 조직유도 재생술에서 재생된 부위의 조직 절편을 관찰해 볼 때 재생 백악질과 치근면의 상아질 사이에서 인공적인 간격이 발견되어¹³⁾, 이러한 재생 백악질과 상아질의 결합은 원래의 백악질과 상아질의 결합만큼 강한 것이 아니라는 의문이 지적되었다¹⁴⁾. 더구나, 재생된 조직에서는 상아질과 백악질을 결합시키는 역할을 수행한다고 생각되고 있는 Hopwell-Smith의 층(Hopwell-Smith Hyaline Layer)¹⁵⁾이 발견되지 않는다는 점, 재생된 백악질이 치주조직 발생시의 백악질(무세포성 백악질)과 달리 세포성 백악질이라는 점, 신생 백악질 주위의 콜라겐 섬유의 주

행이 다르다는 점 때문에 진정한 의미의 치주조직 재생이 아니라는 의문점이 제기되었다¹⁶⁻¹⁸⁾. 이후 치주조직 재생을 향상시키기 위해서 치주인대 세포의 세포활성을 자극시킬 능력이 있는 성장인자 적용¹⁹⁻²¹⁾이나 혈소판 농축 혈장의 이용²²⁻²⁴⁾이 제안되어 왔으며 이들이 치주인대 세포를 활성화시켜 치주조직 재생에 효과가 있다고 한 보고가 있었다.

법랑기질 단백질로 구성된 Emdogain[®]은 치주 병소에 사용시 상피세포의 증식을 억제하며 치주인대 및 조골세포를 활성화시켜 새로운 백악질 및 치주인대와 골조직의 생성을 유도한다고 보고되고 있다³³⁾. 그러나 분자생물학적 기전에 기초한 세포수준의 연구가 부족하여 이에 본 연구에서는 법랑기질 단백질 유도체를 치주인대 세포에 적용하여 치주인대 세포의 분화에 관여하는 PDLs17, PDLs 22, Type I collagen 등의 mRNA 발현을 통해 법랑기질 단백질 유도체의 효과를 살펴보고자 하였다. 최근에는 법랑기질 단백질 유도체가 동물 및 사람에게서 치주 조직을 재생시키는데 효과가 있는 것으로 보고되었다²⁵⁻²⁹⁾. Hammarstrom 등³⁰⁾은 원숭이를 이용한 열개상 골 결손 모델에서 법랑기질 단백질 유도체를 적용하여 조직계측학적으로 검토한 결과 치근면에서 섬유가 삽입된 무세포성 백악질과 이에 수반된 치조골의 신생을 보고하였다. Mellonig 등³¹⁾은 인간의 치주조직 골내 결손부에 법랑기질 단백질 유도체를 사용하여 얻은 조직학적 평가에서 신부착이 일어남을 보고하였고, Pontoriero 등³²⁾과 Sculean 등³³⁾은 췌기상 골 결손부의 치료에 차폐막과 법랑기질 단백질 유도체를 사용했을 때 차폐막과 법랑기질 단백질 유도체 모두 현저한 임상적인 개선이 보여졌으며 두 요법 사이에 통계학적으로 유의한 차이 없이 비슷한 결과를 나타내었다고 보고하였다.

법랑기질 단백질 유도체는 돼지 발생기의 치아에서 추출한 법랑기질 단백질이며 amelogenin이 90% 이상의 성분을 차지하고 있다. 치근 형성시 Hertwig 상피초 내면의 세포는 신생 치근의 상아질 표면에 단백질을 분비하는데 이 단백질이 법랑기질 단백질로 생각되고 있으며³⁴⁾, 법랑기질 단백질이 dental sac 주위의 간엽계 세포를 자극하고 법랑아세포가 치근

상아질 표면으로 유도되어 치근 법랑질이 만들어진 다³⁵⁾. 이 초기에 만들어진 치근 법랑질은 세포 성분을 포함하지 않기 때문에 무세포성 백악질이 되며 무세포성 백악질 내에 Sharpey 섬유가 매입되므로 백악질은 치아를 유지하는 역할을 수행하게 된다. 이처럼 Hertwig 상피초의 세포에서 분비되는 법랑질 기질 단백질은 치근 백악질 형성에 중요한 역할을 수행함과 동시에 치주조직 발생에 중요하다.

이러한 법랑기질 단백질로 구성된 Emdogain[®]은 치주 병소에 사용시 상피세포의 증식을 억제하며 치주인대 및 골조직을 활성화시켜 새로운 백악질 및 치주인대와 골조직의 생성을 유도한다고 보고되고 있다³³⁾. 그러나 분자생물학적 기전에 기초한 세포수준의 연구가 부족하여 이에 본 연구에서는 법랑기질 단백질 유도체를 치주인대 세포에 적용하여 치주인대 세포의 분화에 관여하는 PDLs17, PDLs22, Type I collagen 등의 mRNA 발현을 통해 법랑기질 단백질 유도체의 효과를 살펴보고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

법랑기질 단백질 유도체로는 Emdogain[®](Biora, Sweden)를 사용하였다. 30 mg/ml 단위로 되어 있는 Emdogain을 배양액에 75 µg/ml 농도로 희석하였다. 실험군은 배양액에 Emdogain만을 첨가한 것(EMD)과 배양액에 Dexamethasone과 Emdogain을 첨가한 것(EMD plus DEX)으로 설정하였고, 양성 대조군으로는 배양액에 dexamethasone을 첨가한 것(DEX)으로, 음성 대조군은 배양액에 아무것도 첨가하지 않은 것으로 하였다. 배양액으로는 10% fetal bovine

serum (FBS; Gibco BRL, Rockville, USA) 및 항생제 (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml, gentamycin 50 µg/ml와 fungizone 2.5 µg/ml 등)가 함유된 Dulbecco's modified eagles medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY)을 사용하였다. Emdogain의 농도는 96-well plate에 2 계대 배양된 치주인대 세포를 2×10⁴ 개의 세포가 들어가도록 분주하고 배양액에 다양한 농도의 Emdogain을 첨가하여 3일간 배양한 후 MTT assay를 시행하여 결정하였다. 각 well당 20 µl의 MTT labeling reagent(Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 첨가하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 3시간 배양하고, 배지를 제거한 후 Solubilization solution 120 µl를 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 1시간 후에 ELISA 분석기(Bio-Tek Instrument Inc. USA)로 595 nm와 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 중 높은 수치를 보이는 50 µg/ml와 100 µg/ml의 중간 값을 선택하였다 (Table 1).

2. 치주인대 세포의 배양

조선대학교 치과대학 부속 치과병원에 내원한 치주조직이 건강한 환자로 교정을 위하여 발거된 제 1 소구치의 치근 중앙 1/3에서 얻은 조직들을 무균 작업대에서 항생제가 함유된 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco BRL, Grand Island, NY)으로 수회 세척한 후 해부 현미경하에서 1-2mm³의 크기로 절단하였다.

절단된 조직 단편들을 60mm 세포 배양기 (Falcon, Roskilde, Denmark)에 위치시킨 후 조직의 이동을 방지하기 위하여 슬라이드 글라스를 조직위에 올려 놓고 10% FBS(Gibco BRL)이 함유된 DMEM(Gibco

Table 1. MTT assay of human periodontal ligament treated with Emdogain (Unit; µg/ml)

	0	25	50	100	200	300
1 (595nm)	0.113	0.098	0.105	0.120	0.106	0.102
2 (595nm)	0.176	0.187	0.201	0.199	0.181	0.198
3 (450nm)	0.684	0.714	0.797	0.859	0.786	0.763
mean	0.324	0.333	0.367	0.392	0.357	0.354

BRL)을 이용하여 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 조건에서 배양하였다.

배지는 이틀에 한번씩 교체하고 세포가 증식함에 따라 계대 배양하여 2세대의 세포를 각각 실험에 이용하였다.

3. 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

치주인대 세포를 35-mm dish에 분주하여 세포가 단층으로 증식한 후 ascorbic acid(50 µg/ml)와 β-glycerophosphate(10 mM) 및 실험군 별로 만들어진 배양액을 사용하면서 매 2일마다 배지를 교체하면서 21일간 배양하였다. 배양한 치주인대 세포에서 배양 0일, 7일, 14일 그리고 21일 후 Trizol reagents (Gibco, BRL, Rockville, USA)를 이용하여 각각의 세

포에서 total RNA를 추출하였다. 각각의 RNA들을 total RNA 1 µg 당 25U의 oligo-d(T) primer와 pre-mix(Bioneer)를 이용하여 First-strand cDNA를 합성하였다. PDLs17, PDLs22, Type I Collagen 및 GAPDH의 유전자 염기 서열에 대한 sense와 anti-sense oligonucleotide primer를 주문 제작하였다 (Table 2). Reverse Transcription(RT)과정을 통하여 합성한 cDNA 2 µg과 PDLs17, PDLs22, Type I Collagen 및 GAPDH의 특이적 primer, AccuPower pre-mix(Bioneer Corp., Seoul, Korea)와 그리고 멸균 증류수로 20 µl의 PCR(Polymerase chain reaction) 혼합용액을 만들고 PCR증폭을 시행하였다. Predenaturation 94°C, 5분, denaturation 94°C, 1분으로 하였고 annealing 온도는 각 Primer마다 조건을 달리 하였으며(Table 3), Polymerization 72°C, 1분으로 하였다. PCR 생성물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 유전자들의 발현 양상을 확인하였다.

Table 2. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR

	Sequences 5' 3'	predicted size (bp)
PDLs17	(s) AACAGAGAGGGCAAGCACCA (as) CGCGGATCCTGGGTCGGTTATCAGCTTCACA	400
PDLs22	(s) CGGAATTCATGTTACCGAGTACTT (as) CACTTTTTTATTTCACTCTGAC	761
COL I	(s) TTTGGACATCGGTGGTGC (as) GTTCATCTCTGTCTAGGTC	480
GAPDH	(s) CCATGGAGAAGGCTGGG (as) CAAAGTTGTCATGGATGACC	200

s: sense, as: antisense

COL I : Type I collagen

Table 3. The PCR conditions in this study

	Temperature °C				Time(min)
	PDLs17	PDLs22	COL I	GAPDH	
Predenaturation	94	94	94	94	5
Denaturation	94	94	94	94	1
Annealing	66	45	55	55	1
Polymerization	72	72	72	72	*

*Polymerization time : PDLs17 (1min), GAPDH (1min), COL I (1min), PDLs22 (1.5min)

COL I : Type I collagen

III. 연구 결과

1. 역전사 증합효소 연쇄반응을 이용한 치주인대 특이유전자 mRNA의 발현 분석

배양 치주인대 세포의 RT-PCR을 이용한 PDLs17, PDLs22 및 Type I Collagen mRNA의 발현을 분석하였다(Table 4). Type I Collagen mRNA는 모든 군에서 발현되었으며, 후기 분화단계로 갈수록 약하게 발현되었다(Figure 1A-D).

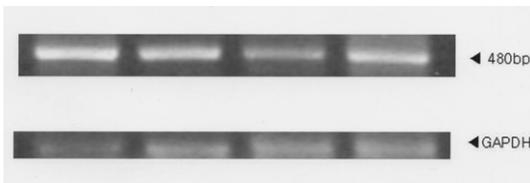
PDLs17의 mRNA 발현은 DEX 처리군인 양성 대조군에서는 배양 14일 후와 21일 후 발현되었고, EMD 처리군에서도 마찬가지로 배양 14일 후와 21일 후 발현되었지만 EMD 처리군이 다소 약하게 발현되었다. EMD plus DEX 처리군에서는 배양 7일 후부터 발현되어 14일 후와 21일 후 모두에서 발현되었다. 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군에서는 배양 21일 후에만 발현되었다(Figure 2A-D).

PDLs22의 mRNA 발현양상은 음성 대조군과 양성

대조군에서는 배양 7일 후에는 발현되지 않았고 배양 14일과 21일 후에는 발현되었다. EMD 처리군은 배양 7일, 14일, 21일 후에 모두 발현되었다. EMD plus DEX 처리군에서는 배양 7일, 14일 21일 후 모두에서 발현되었으며, 21일 후에는 mRNA의 발현이 감소되었다(Figure 3A-D).

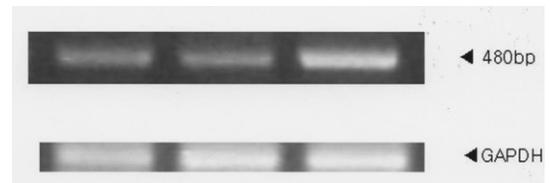
IV. 총괄 및 고안

치주 질환의 치료의 궁극적인 목적은 소실된 연조직의 결합 조직 뿐만 아니라 백악질과 치주인대 및 치조골을 완전하게 재생시켜 정상적인 치아 주위 조직의 부착을 이루는 것이다³⁶⁾. 치주치료 후에 발생하는 치유 형태는 치주치료 후에 생성된 치유공간 내로 먼저 재소집되는 세포에 의해 달라지게 되는데³⁷⁾, 치주인대 내에 백악질과 치조골을 형성할 수 있는 세포로의 분화가 가능한 세포가 존재할 가능성은 제시되었으나, 이들 세포들의 실제 치조골과 백악질을 형성하는 세포로의 분화 기전에 관한 연구는 미비한



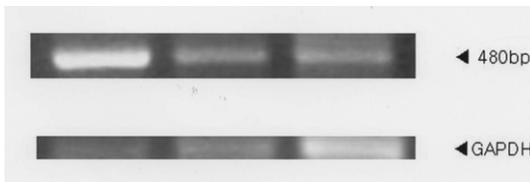
A.

days	0	7	14	21
den		2,08	2,20	2,127



B.

days	7	14	21
den	1	1	1



C.

days	7	14	21
den	2,50	2,05	1,63



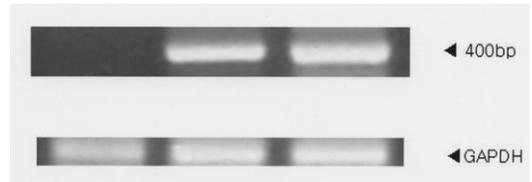
D.

days	7	14	21
den	0,94	0,89	0,89

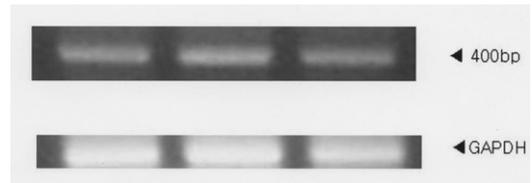
Figure 1(A-D). Effect EMD on the mRNA expression of type I collagen in the culture of human PDL cells at 0, 7, 14, 21 days. A: negative control group, B: DEX-treated group, C: EMD-treated group, D: EMD plus DEX treated group. den : relative amount of mRNA repair to the control group



A.
 days 0 7 14 21
 den 0,67



B.
 days 7 14 21
 den 1 1



C.
 days 7 14 21
 den 0,75 0,52



D.
 days 7 14 21
 den 0,78 0,70

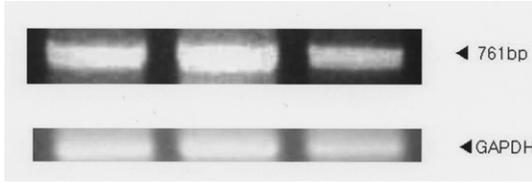
Figure 2(A-D). Effect of EMD on the mRNA expression of PDLs17 in the culture of human PDL cells at 0, 7, 14, 21 days. A: negative control group, B: DEX-treated group, C: EMD-treated group, D: EMD plus DEX treated group. den : relative amount of mRNA repair to the control group



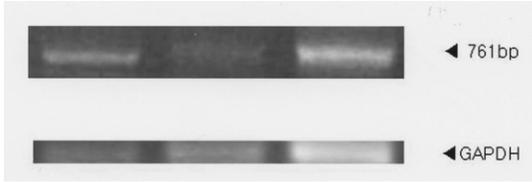
A.
 days 0 7 14 21
 den 0,53 0,54



B.
 days 7 14 21
 den 1 1



C.
 days 7 14 21
 den 0,47 0,45



D.
 days 7 14 21
 den 1,09 1,04

Figure 3(A-D). Effect of EMD on the mRNA expression of PDLs22 in the culture of human PDL cells at 0, 7, 14, 21 days. A: negative control group, B: DEX-treated group, C: EMD-treated group, D: EMD plus DEX treated group. den : relative amount of mRNA repair to the control group.

실정이다. 따라서 먼저 치아를 지지하며 백악질과 치조골을 형성하고 또한 다양한 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가진 치주인대 세포의 발생과 분화에 관련한 분자생물학적 기전에 관한 연구가 필수적 요소라고 할 수 있다^{38,39}).

치주조직의 발생은 상피-간엽간의 순차적이고 상호 보완적인 신호전달에 의해 조절되고 치아낭(dental follicle)의 세포들은 Hertwig 상피근초의 하방 증식을 시작으로 하여 백악질, 치주인대 및 치조골을 형성하는 세포로 분화하게 된다⁴⁰. Bosshardt와 Nanci⁴¹)는 bone sialoprotein, osteopontin과 enamel인 Hertwig 상피근초에서 일시적으로 분비된다고 보고하였는데, 이러한 기질의 polypeptide가 인접한 치아낭의 세포를 백악아모세포 전구세포나 섬유아세포로 분화시키는 분화시키는 유도 인자인지에 대해서는 명확하지 않다. 법랑기질 단백질이 백악질 형성과정에서 이러한 화학 유도 물질로 작용할 것으로 추측되고 있으며, 1997년에 Hammarstrom³⁵)은 치아낭의 간엽세포가 법랑기질에 노출되면 무세포성 경조직이 법랑질 표면에 형성되는 것을 관찰했고, 법랑기질의 주성분인 amelogenin이 치근형성 과정에서 나타나는 것을 보고하였다. 법랑기질 단백질 유도체는 돼지 발생기의 치아에서 추출한 법랑기질 단백질이며 amelogenin이 90%이상의 성분을 차지하고 있으며, Gestrelus⁴²)이 세포 배양액에 법랑기질 단백질 유도체를 첨가하였을 때 치주인대 세포의 증식을 증가시킬 뿐 아니라 단백질과 콜라겐 합성도 증가시키고, 석회화 결정의 형성도 증진시킨다고 보고하였고, 또한 Lyngstadaas^{43,44})은 치주인대 세포에 법랑기질 단백질 유도체를 처리하였을 때 세포 부착율, 성장률, 기질 대사, alkaline phosphatase 활성, 그리고 TGF- β 1, IL-6, PDGF-AB등의 성장인자 유리를 증가시키는 것을 보고하였다. Sema⁴⁵)은 법랑기질 단백질 유도체를 치아낭 세포에 적용하였을 때 골 형성 표지 인자인 osteocalcin의 발현은 감소시키고, bone sialoprotein과 osteopontin의 발현은 증가시키며, 골 결절 생성이 증가되었다고 보고하였으며, Haase⁴⁶)은 법랑기질 단백질 유도체를 치은 섬유아세포에 적용하였을 때 치주조직 치유와 재생에 필요한 proteo-

glycans versican, biglycan, 그리고 decorin등의 세포 기질 합성을 증가시킨다고 하였다.

실험실 세포실험에서 치주인대 세포의 분화는 항상 dexamethasone 처치를 필요로 하며⁴⁷), 이를 배양액에 첨가시켰을 때 조골 세포를 분화시켜 골형성을 증가시키고⁴⁸), dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주인대 세포뿐 아니라 조골세포도 결절이나 그와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못하였다는 보고가 있다⁴⁹). 따라서, 법랑기질 단백질 유도체가 골 형성을 증가시키는지 알아보기 위하여 배양액에 ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 첨가하고, dexamethasone 대신 법랑기질 단백질 유도체를 첨가한 군과, dexamethasone과 법랑기질 단백질을 병합한 군을 실험군으로 하였으며, 양성 대조군은 dexamethasone을 첨가한 군으로 하고, 음성 대조군으로는 배양액에 ascorbic acid와 β -glycerophosphate만을 첨가한 것으로 하였다.

치주인대 세포를 21일 동안 배양하여 RT-PCR로 분석한 결과, PDLs17의 mRNA는 dexamethasone이나 법랑기질 단백질 유도체를 첨가하지 않은 음성 대조군에서는 배양 21일 후 발현되었으며, dexamethasone을 첨가한 양성 대조군에서는 배양 14일 후부터 발현되었다. 실험군 중에서 법랑기질 단백질 유도체만을 첨가한 군에서도 발현정도가 약하였지만 dexamethasone을 첨가했던 군과 마찬가지로 배양 14일 후부터 PDLs17의 mRNA가 발현되었다. dexamethasone이 배제된 조건에서 dexamethasone을 첨가한 군과 발현 시기가 비슷한 것으로 보아 법랑기질 단백질 유도체가 치주인대의 분화를 촉진시키는 것으로 볼 수 있다. 그리고 dexamethasone과 법랑기질 단백질 유도체를 병합하여 배지에 첨가한 군에서는 배양 7일 후부터 mRNA가 발현되었고, 이는 dexamethasone과 법랑기질 단백질 유도체의 병합이 치주인대 세포의 분화를 촉진시킨 결과라 생각할 수 있다. PDLs22의 mRNA는 음성 대조군과 양성 대조군에서 배양 14일 후부터 발현되었다. 법랑기질 단백질 유도체만을 첨가한 군과 법랑기질 단백질 유도체와 dexamethasone을 병합하여 첨가한 군에서는 배양 7일 후부터 PDLs22 mRNA가 발현되었지만,

dexamethasone을 첨가한 군보다는 약하게 발현되었고, 이러한 결과 역시 법랑기질 단백질 유도체가 치주인대의 분화를 촉진시키는 것으로 볼 수 있으나, dexamethasone을 첨가한 군과 음성 대조군이 비슷한 시기에 발현되는 것에 관하여는 보다 깊은 연구가 시행되어야 할 것이다.

치주 인대 세포의 초기 분화단계에 나타나는 Type I collagen은 모든 군에서 발현되었으며, 음성 대조군에서 강한 발현을 보였고, 후기 분화 단계로 갈수록 약하게 발현되는 양상을 보였다. 이는 음성 대조군이 분화가 늦기 때문으로 사료되며, 분화가 빨리 진행되는 법랑기질 단백질 유도체 또는 dexamethasone을 첨가한 군이나 법랑기질 단백질 유도체와 dexamethasone을 병합하여 첨가한 군에서는 다소 약하게 발현되었다. 이러한 결과는 Type I collagen은 골 결절이 형성되기 전 단계에서 높게 발현되며 collagen의 합성과 침착 후에 골 결절이 형성된다는 Rahime^등⁵⁰⁾의 연구 결과와 일치한다.

본 실험의 결과는 법랑기질 단백질 유도체가 치주인대 세포에 미치는 효과를 PDLs17, PDLs22 그리고 Type I collagen의 mRNA의 발현으로 살펴보았다. 법랑기질 단백질 유도체를 적용하였을 때 PDLs17과 PDLs22의 발현이 보다 빨리 나타나는 것으로 미루어 보아 법랑기질 단백질 유도체가 치주인대 세포의 분화를 촉진시키는 것으로 여겨지나 mRNA의 발현 양상만을 본 것이므로 Northern analysis나 농도에 따른 효과 연구 등의 보다 세밀한 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 치주인대 세포에 법랑기질 단백질 유도체를 처리하였을 때의 효과를 치주 인대 세포 특이 유전자인 PDLs17, PDLs22 그리고 Type I collagen의 mRNA 발현을 통해 알아보고자 하였다.

1. PDLs17의 mRNA는 법랑기질 단백질 유도체만을 첨가한 군, dexamethasone만을 첨가한 군에서는 배양 14일, 21일에 발현되었으며 법랑기질

단백질 유도체 및 dexamethasone을 병합하여 첨가한 군에서는 배양 7일, 14일, 21일 모두에서 발현 되어 그 발현 시기가 빠르게 나타났다. 음성 대조군에서는 배양 21일에서만 발현 되었다.

2. PDLs22의 mRNA는 법랑기질 단백질 유도체를 첨가한 군에서는 배양 7일, 14일, 21일부터 발현되었으며, dexamethasone을 첨가한 군에서는 배양 14일과 21일에 발현되었다. 법랑기질 단백질 유도체 및 dexamethasone을 병합하여 첨가한 군에서는 7일, 14일, 21일에서 발현되어 그 발현시기가 빠르게 나타났다. 음성 대조군에서는 배양 14일, 21일에 발현되었다.
3. Type I collagen은 모든 군에서 발현되었으며, 후기 분화단계로 갈수록 약하게 발현되었다.

법랑기질 단백질 유도체를 치주인대에 적용하면 dexamethasone이 없어도 치주인대 세포의 분화를 촉진시킬 수 있으며, 법랑기질 단백질 유도체 및 dexamethasone을 병합하여 첨가하게 되면 PDLs17과 PDLs22의 mRNA가 빠르게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 법랑기질 단백질 유도체는 치주인대 섬유아세포의 분화를 촉진시키며, 이는 법랑기질 단백질 유도체를 치주조직 재생 술식에 응용할 수 있는 근거를 제공해 주는 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. McCulloch, C.A.G.. Basic Considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration, *Periodontology* 2000., 1: 16-25, 1993.
2. Nyman, S. Gottlow, J. Karring, T et al.. The regenerative potential of periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *Journal of Clinical Periodontology.*, 7: 257-265, 1982.
3. Nilda, A. John, J.S. Jennifer, M Et al.. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *Journal of Periodontology.*, 62: 499-503, 1991.

4. Howes, R. Bowness, J.M. Grotendorst, G.M et al., Platelet-derived growth factor enhances demineralized bone matrix-induced cartilage and bone formation, *Calcif Tissue Int.*, 42: 34-38, 1998.
5. Dennison, D.K, Valline, D.R, Pinero, G,J et al., Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts, *Journal of Periodontology.*, 65: 641-648, 1994.
6. Canalis, E. McCarthy, T. Centrella, M., Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *Journal of Clinical Invest.*, 81: 1572-1577, 1988.
7. Nohutcu, R.M, Somerman, M.J, McCauley, L.K., Dexamethasone enhances the effects of parathyroid hormone(PTH) on human periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int.*, 56: 571-577, 1995.
8. Reddi, A.H, Cunningham, N.S., Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenic proteins. *Journal of Bone Miner Res.*, 8(suppl 2): S499-502, 1993.
9. Park, J.C, Kim, H.J, Jang, H,S et al., Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun.*, 282(5): 1145-1153, 2001.
10. Caton, J, Nyman, S, Zander, H., Histometric evaluation of periodontal surgery. II . Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *Journal of Clinical Periodontology.*, 7: 224-231, 1980.
11. Melcher, A.H., On the repair potential of periodontal tissue. *Journal of periodontology.*, 47: 256-260, 1976.
12. Karring, T, Nyman, S, Gottrow, J et al., Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontology 2000.*, 1: 26-35, 1993.
13. Nyman, S, Lindhe, J, Karring, T et al., New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical periodontology.*, 9: 290-296, 1982.
14. Egellberg, J., Regeneration and repair of periodontal tissue. *Journal of Periodontal Research.*, 22: 233-242, 1987.
15. Tomeck, C.D., Dentin-Pulp complex. In : *Oral histology: Development, structure and function*, ed Ten Cate, A.R. The mosby company, St Louis., 1980, pp140-181.
16. Araujo, M, Berglundh, T, Lindhe, J., The Periodontal tissue in healed degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology.*, 23: 532-541, 1996.
17. Araujo, M, Lindhe, J., GTR treatment of degree III furcation defects following application of enamel matrix proteins An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology.*, 25: 524-530, 1998.
18. Hirooka, H., The biological concept for the use of EMDOGAIN?. *True periodontal regeneration*, Quintessence International., 29: 624-630, 1998.
19. Caffese, R.G, Quinones, C.R., Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology 2000.*, 1: 69-79, 1993.
20. Oates, T,W, Rouse, C,A, Cochran, D,L., Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Periodontology.*, 64: 142-148, 1993.
21. Terranova, V,P, Wikesjo, U,M,E., Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. *Journal of Periodontology.*, 58: 371-380
22. Marx, R,E, Carlson, E,R, Eichstedt, R,M, et al., Platelet-rich plasma :Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral asurg Oral Med Oral*

- Pathol., 85: 638-546, 1998
23. Anitua, E.. Plasma rich in growth factors:Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, 14: 529-535, 1994.
 24. Jiang, D. DZiak, R. Lynch, S.E. et al.. Modification of Bio-Oss with growth factors: Effects on osteoblastic cell proliferation. *Journal of Periodontol.*, 69: 638-646, 1998.
 25. Gunnar, H.. Treatment of human periodontal infrabony defects with Emdogain. Case report: Clinical and radiographic examination after one year of treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 1: 19-31, 2000.
 26. Giulio, R. Giano, R. Maurizio, S.. Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 1: 59-67, 2000.
 27. Stuart, J.F.. A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects. *Journal of Periodontology.*, 72: 25-34, 2001.
 28. Anton, S.. The effect of postsurgical antibiotics on the healing of intrabony defect following treatment with enamel matrix protein. *Journal of Periodontology.*, 72: 190-195, 2001.
 29. Raymond, A. Yukna.. Histologic evaluation of periodontal healing in humans following regenerative therapy with enamel matrix derivative. *Journal of Periodontology.*, 71: 752-759, 2000.
 30. Hammarstrom, L. Heijl, L. Gestrelus, S.. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *Journal of Clinical Periodontology.*, 24: 669-677, 1997.
 31. Mellonig, J.T. Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: Technique, clinical and histologic case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 19: 8-19, 1990.
 32. Pontoriero, R et al.. The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. *Journal of Clinical Periodontology.*, 26: 833-840, 1999.
 33. Sculean, A. Donos, N. Blaes, A. et al.. Enamel matrix proteins (Emdogain) and Guided tissue regeneration in the treatment of intrabony periodontal defects: A split-mouth clinical study. *Journal of Dent Res.*, 77: 924-929, 1998.
 34. Slavkin, H.C. Bringas, P. Bessen, C. et al.. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *Journal of Periodontal research.*, 23: 28-40, 1988.
 35. Hammarstrom, L.. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *Journal of Clinical Periodontology.*, 24: 658-668, 1997.
 36. Amar, S.. Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration. *Anatomical Record.*, 245: 361-373, 1996.
 37. Iglhaut, J. Aukhil, I. Simpson, D.M. et al.. Progenitor cell kinetics during Guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *Journal of Periodontal Research.*, 23: 107-117, 1988.
 38. Brandsten, C. Lundmark, C. Christersson, C. et al.. Expression of collagen $\alpha 1(I)$ mRNA variants during tooth and bone formation in the rat. *Journal of Dental Research.*, 78(1): 11-19, 1999.
 39. Remarkkrishnan, P.R. Lin, W.L. Sodek, J. et al.. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int.*, 57: 52-59, 1995.
 40. Cho, M.I. Garant, P.R.. Development and general structure of the periodontium.

- Periodontology 2000., 24: 9-27, 2000.
41. Bosshardt, D.D. Nanci, A., Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner and outer epithelial cells. *Journal of Histochem Cytochem.*, 46: 135-142, 1998.
 42. Gastreluis, S. Andersson, C. Lidstrom, D. et al., In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *Journal of Clinical Periodontology* ., 24: 685-692, 1997.
 43. Lyngstadaas, S.P. Lundberg, E. Ekdahl, H. et al., Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *Journal of Clinical Periodontology.*, 28: 181-188, 2001.
 44. Monique T, V.D.P. Theo, V.D.B. Vincent, E. et al., Enamel matrix derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor β release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *Journal Periodontolgy.*, 71: 31-43, 2000.
 45. Sema, S.H. Janice, E.B. Martha, J.S. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *Journal of Periodontology.*, 72: 679-687, 2001.
 46. Haae, H.R. Bartold, P.M. Enamel matrix derivative induces matrix synthesis by cultured human periodontal fibroblast cells. *Journal of Periodontology.*, 72: 341-348, 2001
 47. Mukai, M. Yoshimine, Y. Akamine, A. et al., Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res.*, 271: 453-460, 1993.
 48. Tenenbaum, H.C. Heersche, J.N.M., Dexamethasone stimulates osteogenesis in click periosteum in vitro. *Endocrinology.*, 117: 2211-2217, 1985
 49. Arceo, N. Sauk, J.J. Moehring, J. et al., Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *Journal of Periodontology* ., 62: 499-503, 1991.
 50. Rahime, M.N. Laurie, K.M. Amy J.K. et al., Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. *Journal of Periodontology.*, 68: 320-327, 1997.

Effect of Enamel Matrix Derivatives application on the expression of PDLs17, PDLs22 of cultured human periodontal ligament cells in vitro

Geun-A Han¹, Hyun-seon Jang¹, Jung-Ki Kok², Ju-Chol Park³,
Heoung-Jung Kim⁴, Jung-Gwan Kim⁵, Byung-Ock Kim¹

Dept, of periodontology, college of dentistry, Chosun University¹

Dept, of biochemistry, college of dentistry, Chosun University²

Dept, of oral histology, college of dentistry, Chosun University³

Dept, of anatomy, college of dentistry, Chosun University⁴

Dept, of periodontology, college of dentistry, Yonsei University⁵

The enamel matrix derivative (EMD) has been recently used in the periodontal regenerative techniques. The present study was established to investigate the influence of EMD on human periodontal ligament cells using expression of mRNA of periodontal ligament specific gene (PDLs)17, PDLs22, type I collagen when EMD applied to periodontal ligament cells. Periodontal ligament cells were obtained from a healthy periodontium and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus 10% fetal bovine serum and β -glycerophosphate with ascorbic acid. Test groups were two; One adds EMD in culture media and another added EMD and Dexamethasone (DEX) in culture media. Positive control group added DEX in culture media, and negative control group adds neither of EMD nor DEX. Emdogain[®] (Biora, Sweden, 30 mg/ml) was diluted by 75 μ g/ml concentration to culture media.

For reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), total RNA isolated on days 0, 7, 14 and 21. mRNA of PDLs17 was expressed on days 14 and 21 in EMD or DEX group, and expressed on days 7, 14 and 21 in EMD plus DEX group, the other side, expressed on days 21 in negative control group. mRNA of PDLs22 expressed on days 7, 14 and 21 in EMD group, and expressed on days 14 and 21 in DEX group, and expressed on days 7, 14 and 21 in EMD plus DEX group. Negative control group expressed on days 14 and 21. Type I collagen was expressed on all days and all groups. These results indicate that EMD promotes differentiation of periodontal ligament cells, and this is considered to offer basis that can apply EMD to periodontal tissue regeneration technique.

Key words : Enamel Matrix Derivate, PDLs17, PDLs 22, periodontal ligament