

법랑기질유도체를 도포한 타이태늄 표면에서 조골세포의 증식 및 분화

박상현¹, 이인경¹, 양승민², 신승윤¹, 이용무¹, 구영¹, 류인철¹, 정종평¹, 한수부¹, 최상묵¹

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실, ²성균관대학교 의과대학 치과학 교실

I. 서론

치주치료의 가장 중요한 목적은 상실된 치주조직의 형태적, 기능적 재건이다. 치주 질환으로 인하여 상실된 치주조직을 회복시키기 위해서 다양한 재생술식이 사용되고 있다. 진정한 의미의 치주조직 재생은 일반적인 치주치료의 결과로 나타나는 긴 상피 부착에 의한 치주조직의 회복이 아니라 질환에 이환된 치근표면에 무세포백악질이 생성되고, 새로운 치주인대가 신생 치조골과 이 백악질을 기능적으로 연결시키는 것을 말한다. 치조골과 이 백악질에 교원 섬유가 함유된 이른바 기능적으로 재배열된 치주인대가 재생되는 것을 말한다.^{1,2)} 이러한 목적을 달성하기 위하여 다양한 형태와 종류의 골 이식재 및 차폐막을 이용한 조직유도재생술(Guided Tissue Regeneration, GTR), 테트라사이클린과 구연산등을 이용한 치근면 처치술등이 이용되고 있으며, 최근에는 성장인자나 골형성단백질(bone morphogenetic protein, BMP), 법랑기질단백질(enamel matrix protein)과 같은 단백질의 적용이 시도되고 있다.

법랑기질유도체는 일반적으로 이용할 수 있는 재생술식들과 관련되는 단점들을 극복하기 위해 최근 치주 영역에 소개되었다. 돼지의 법랑기질유도체(enamel matrix derivatives, EMD)는 amelogenin이 90%이상의 성분을 차지하고 있다. 1997년 Hammarström 등³⁾이 원

승이를 대상으로 담체와 함께 혹은 단독으로 인위적으로 형성된 치조골의 협측 결손부에 적용한 결과 8주째에 거의 완전한 신생 백악질과 교원섬유 및 신생치조골의 재생을 보고한 바 있으며, 그 후 임상 적용 결과 치주낭 깊이 감소와 부착수준 증가가 보고된 바 있다^{4,5)}. 지난 몇 년 동안의 골내낭의 결손부 치료에 법랑기질유도체를 이용한 유도재생술식의 축적된 연구들은 통상적인 치주수술후 법랑기질유도체를 처리하면 처치하지 않았을 때의 결과보다 우수한 결과를 보고하였다⁶⁾. 인위적으로 유발한 치주질환에서의 연구나 인위적 결손부에서의 법랑기질유도체의 조직학적 연구에서 법랑기질유도체는 무세포백악질(acellular cementum)을 형성하고, 치주조직의 중요한 이형성을 촉진하는 결과를 보이고 있다³⁾. 여러 가지 골내낭에 대한 임상연구에서도 우수한 치주조직의 재생을 나타내는 연구결과가 많다⁷⁻¹⁰⁾. 법랑기질유도체는 치주인대세포에 미치는 영향 외에도 골조직의 조골세포에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다³⁾. 골유착성 임플란트는 이미 결손된 치아의 대체물로서 널리 사용되어지고 있는데 수술과정이나 수술 후에 염증의 영향으로 골 조직에의 유착을 실패하거나 보철 후 기능을 발휘하다가 염증의 영향이나 교합하중에 의해 매식체 주위염이 발생한다. 매식체와 골 조직의 계면은 임플란트가 기능을 유지하기 위해서는 매우 중요하다. 근 골격계내에서 임플란트가 하중을 견뎌내기 위해서는 매식된 후에

임플란트의 표면으로 골 조직이 자라들어 와야 하며 접착된 골 조직의 성질 또한 좋아야 한다. 즉, 임플란트가 오랫동안 기능을 발휘하고 유지하기 위해서는 해면골이 자라들어 와서 기계적 생물학적 고정을 이루어야 한다. 계면의 골 반응은 매식 방법과 사용되어진 생체재료에 의해 영향을 미치기 때문에 임플란트와 골 조직의 결합을 위하여 많은 종류의 물리화학적 생체재료가 이용되어 지고 있다.

이러한 관점에서 보면 백아질과 치주인대와 치조골의 생합성을 촉진시킴으로 치주조직 재생을 유도하는 법랑기질단백질과 최근에 개발된 법랑기질유도체에 관심을 가질만하다. 세포실험에서 법랑기질유도체가 치주인대세포의 총 단백질생성과 증식을 촉진하고 치주인대세포의 광화소결정의 생성을 증진시킨다²⁾. 치주인대세포의 조직공학적인 관점에서 법랑기질유도체는 치조골과 치주조직의 재생에 효과적인 생물학적 도구이다. 임플란트와 골 조직의 더 우수한 결합을 위하여 법랑기질유도체를 사용하거나 매식체 주위염의 치료 방법으로 법랑기질유도체의 사용이 임상적으로 시도되어 지고 있으나 타이태늄 표면에 법랑기질유도체를 적용하였을 때의 조골세포에 미치는 영향에 관한 보고는 거의 없는 실정이다.

이 연구에서는 법랑기질유도체가 피복된 타이태늄 표면에서의 조골세포의 증식 및 분화에 법랑기질유도체가 미치는 효과를 알칼리성인산분해효소의 활성도와 alkaline phosphatase, osteopontin, bone sialoprotein, BMP-2, collagen type I 등 골형성관련 특이단백질들의 mRNA 발현을 통해 알아보려 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

직경 25mm, 두께 1mm의 타이태늄 디스크를 제작하였다. 타이태늄 디스크에 25, 50, 100, 200 μ g/ml 농도의 법랑기질유도체(Emdogain[®], BIORA, Sweden)를 피복한 것을 실험군(EMD25, 50, 100, 200)으로 하였으며, 유전자재조합형 골형성단백질(rhBMP-2, R&D System, USA)을 25, 50, 100, 200ng/ml의 농도로 타

이태늄 디스크에 피복한 군을 양성대조군(BMP25, 50, 100, 200)으로 사용하였다. 각 농도의 EMD와 BMP 용액이 들어있는 세포배양접시(6 well plate, NUNC[®], Denmark)에 타이태늄 디스크를 넣고, 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 적용시킨 후, PBS로 3회 세척하여 타이태늄 디스크에 피복되지 않은 단백질을 제거하였다. 비특이적 세포부착을 차단하기 위하여 2% 우혈청단백질(BSA, bovine serum albumin)에 타이태늄 디스크를 2시간 동안 담가둔 후 PBS로 수세 후, 세포를 접종시켰다. 타이태늄 디스크에 PBS만 적용시킨 군을 음성대조군으로 하였다.

2. 세포 배양

조골세포인 Saos-2세포(ATCC HTB -85)를 100mm 크기의 세포배양용 접시에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco/BRL, Grand Island, NY, U.S.A)과 100U/ml의 penicillin, 100 μ g/ml의 streptomycin이 함유된 α -MEM 용액을 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합배양기에서 배양시켰다.

3. 세포 부착 및 세포 증식능 측정

배양된 세포에 0.25% trypsin과 4mM EDTA 혼합용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하여 부착된 세포를 분리한 후, 혈구계수기로 세포수를 세어 well 당 1×10^5 개의 세포가 들어가도록 접종하였다. 배양 1일, 6일째에 시편을 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, USA)으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 0.25% trypsin, 4mM EDTA 혼합용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하여 부착된 세포를 시편으로부터 탈리시킨 후 tryphan blue로 염색하고 혈구계산기로 염색되지 않은 세포의 수를 측정하였다.

4. 알칼리성인산분해효소의 활성 측정

세포 증식능 측정을 위해 사용된 동일한 세포를 이용하여 알칼리성인산분해효소의 활성도를 측정

하였다. 배양 1일 및 6일 후 0.25% trypsin과 4mM EDTA 혼합용액으로 처리하고 1200rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 세포를 얼음 위에서 초음파분쇄기(Fisher, USA)를 이용하여 1분간 초음파 파절하였다. 0.1ml의 세포분쇄액에 0.1M glycine-NaOH buffer, 15mM p-nitrophenol phosphate(p-NPP), 0.1% Triton X-100 /saline, DDW을 첨가하여 37°C에서 반응시키고, 30분후 냉장된 0.1N NaOH를 가하여 반응을 중지시켰다. 알칼리성인산분해효소에 의해 분해되어 생성된 p-nitrophenol(p-NP)을 405nm에서 microplate reader로 비색 정량하였다.

5. 역전사 중합효소반응(Reverse trans criptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

타이태늄 디스크를 6 well plate에 넣은 후 배양된 Saos-2세포를 well 당 2×10^5 개의 수가 되게 접종한

후, 2시간, 8시간 후에 0.25% trypsin, 4mM EDTA 혼합용액을 넣어 타이태늄 디스크에서 세포를 분리시키고 원심분리하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포를 PBS로 3회 수세한 후, High Pure RNA Isolation kit(Roche, Germany)로 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 역전사효소, RNase inhibitor 등이 포함된 First Strand cDNA Synthesis kit(Roche Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 즉, RNA 1.0 μ g과 oligo dT₁₅ primer 1.0 μ g을 혼합한 후, 70°C heating block에서 5분간 반응시키고 나서, 동일한 block에서 42°C에서 60분간 반응시키고, 역전사효소의 비활성화를 위해 94°C에서 5분간 반응시켰다. 이렇게 하여 얻은 cDNA 1 μ l와 20pmole의 primer를 DNA 중합효소, dNTPs 및 reaction buffer 등이 포함된 AccuPower PCR PreMix(Bioneer, Korea)에 넣고 증류수를 가하여 50 μ l로 만든 후, thermal cycler(Eppendorf, Germany)를 이용하여 중합효소연

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR.

	Sequence	Expected size of PCR product (bp)
Human COL I	(s) 5'-TATGGCGGCCAGGGCTCCGACCCTG-3' (as) 5'-CCAAGGGGGCCACATCGATGATGGG-3'	325
Human ALP	(s) 5'-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3' (as) 5'-CTGGTAGGCGATGTCCTTA-3'	475
Human OPN	(s) 5'-CCAAGTAAGTCCAACGAAAG-3' (as) 5'-GGTGATGTCCTCGTCTGTA-3'	347
Human BSP	(s) 5'-TCAGCATTITGGGAATGGCC-3' (as) 5'-GAGGTTGTTGTCTTCGAGGT-3'	615
Human BMP-2	(s) 5'-GAAACGCCTTAAGTCCAGCTGT-3' (as) 5'-CTAGCGACACCCACAACCCTC-3'	
Human 18S rRNA	(s) 5'-GCGAATTCCTGCCAGTAGCATATGCTTG-3' (as) 5'-GGAAGCTTAGAGGAGCGAGCGACCAAGG-3'	126

* s : sense, as : antisense

* COL I : Type I collagen, ALP : Alkaline phosphatase, OPN : Osteopontin, BSP : Bone sialoprotein.

Table 2. The PCR conditions used in this study

	Temperature(°C)	Time(min)
Pre-denaturation	94	5
Denaturation	94	1
Annealing	*	2
Polymerization	72	1

* Annealing temperature : Collagen type I (55°C), Alkaline phosphatase (44°C), BMP-2 (60°C), Osteopontin (44°C), Bone sialoprotein (55°C)

쇄반응을 실시하였다. 반응에 사용된 primer의 염기 서열과 크기 및 반응의 조건들은 Table 1, 2와 같다. PCR 생성물은 2% agarose gel상에서 전기영동을 시행하였으며, 0.5 μ g/ml ethidium bromide로 염색하여 GelDoc 2000 Gel Documentation System(BIO-RAD, U.S.A.)으로 확인하였다. 발현된 mRNA의 양을 측정하기 위하여 semi-quantitative RT-PCR 법을 이용하였다. 즉 각각의 PCR 생성물을 전기영동한 후 band의 intensity를 GelDoc 2000 Gel Documentation System으로 측정하고, 측정된 조골세포분화 표지자의 band의 intensity를 18s rRNA의 band의 intensity로 나누어 상대적인 mRNA의 발현량을 계산하였다.

6. 세포-시편 혼합체의 주사전자현미경적 관찰

직경 6mm의 타이태늄 디스크가 들어있는 24well plate에 배양된 Saos-2 세포를 1×10^4 개가 되도록 각 접종하였다. 배양 2시간 후 시편내의 세포부착양상을 주사전자현미경(SEM)을 통하여 관찰하였다. 배양된 세포-시편 혼합체를 2.5%의 glutaraldehyde 고정액에서 20분간 고정한 후, PBS 용액으로 2회에 걸쳐 10분간 수세하였다. 1% OsO₄ 용액(Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA)으로 후 고정하고 나서 다시 PBS 용액으로 2회에 걸쳐 수세하였다. 70, 80, 90, 95, 100% ethanol로 순서대로 탈수 후, 금으로 박막처리 시켜 주사전자현미경(Jeol,

Japan) 관찰을 실시하였다.

7. 통계분석

세포증식능과 알칼리성인산분해효소의 활성을 SPSS 10.0(SPSS, Chicago, IL)를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 각 군간의 세포증식능 비교는 ANOVA 분석 및 Turkey의 사후 검정법을 이용하였으며, 알칼리성인산분해효소의 활성에서 각 시간별로 대조군과 다른 군간의 비교는 Mann-Whitney 검정법을 이용하여 검증하였다(p<0.05).

III. 결과

1. 세포의 증식

EMD와 BMP가 피복된 타이태늄 디스크에 접종된 Saos-2세포의 증식능을 배양 1일 및 6일째 관찰하였다. 배양 1일째에 EMD 투여군에서는 EMD100이, BMP 투여군에서는 BMP200에서 가장 높은 세포증식능을 나타내었다. 배양 6일째의 증식능 관찰 결과에서도 EMD100군과 BMP200군에서 가장 높은 세포증식능을 보였다. EMD 투여군에서는 EMD50군을 제외한 모든 농도군에서, BMP 투여군의 경우에는 100ng/ml이상의 농도군에서 대조군에 비하여 유의성있는 세포증식을 나타내었다(p<0.05). 그러나 사

Table 3. Cell Proliferation test by hemocytometry ($\times 10^4$ cell count)

	1 day	6 day
EMD200	5,111 \pm 1,900	10,833 \pm 1,602* [‡]
EMD100	6,667 \pm 2,958	14,333 \pm 1,366* ^{†‡}
EMD50	5,000 \pm 2,915	8,667 \pm 0,816*
EMD25	5,778 \pm 3,801	12,667 \pm 1,506 ^{†‡}
BMP200	5,333 \pm 4,359	12,500 \pm 1,049 [‡]
BMP100	5,000 \pm 2,000	10,167 \pm 0,983 [‡]
BMP50	2,556 \pm 2,351	4,167 \pm 1,722
BMP25	2,556 \pm 1,740	5,333 \pm 1,366
Control	3,556 \pm 1,590	6,667 \pm 1,211

* There were statistically significant differences compared with EMD100

[†] There were statistically significant differences compared with EMD50

[‡] There were statistically significant differences compared with Control

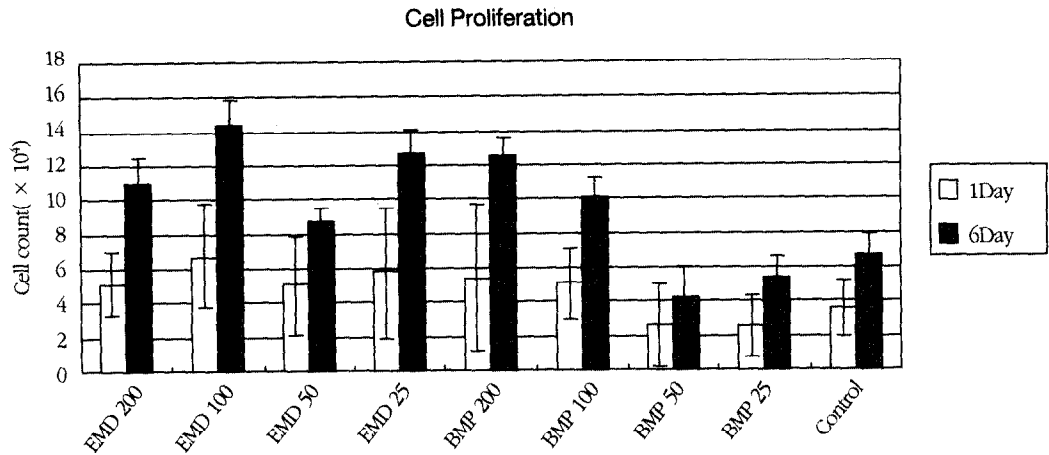


Figure 1. Cell proliferation test by hemocytometry($\times 10^4$ cell count)

용된 EMD 농도사이에는 EMD100에 비교하여 EMD200, EMD50은 유의성있는 차이를 나타냈으며 ($p < 0.05$), EMD50에 비교하여 EMD100, EMD25에서 유의성있는 차이를 나타냈다($p < 0.05$) (Table 3, Figure 1).

2. 알칼리성인산분해효소의 활성 측정

EMD와 BMP가 피복된 타이태늄 디스크에 접종된 Saos-2 세포의 알칼리성인산분해효소의 활성도를 배양 1일 및 6일째 관찰하였다. 배양 1일째 EMD 투여군에서는 EMD100이, BMP 투여군에서는 BMP200이 활성도가 가장 높게 나타났으나 각 군간의 통계학적

인 유의성은 없었다($p > 0.05$). 배양 6일째 관찰에서, EMD 투여군에서는 EMD100이, BMP 투여군에서는 BMP100이 활성도가 가장 높게 나타났다. 1일에 비교하여 EMD 투여군에서는 EMD200, EMD100이, BMP 투여군에서는 BMP200, BMP100의 6일째의 활성도가 유의성있는 차이를 보였다($p < 0.05$) (Table 4, Figure 2).

3. 역전사 증합효소연쇄반응을 이용한 조골세포 특이적 유전자의 발현

조골세포의 특이적 유전자의 발현을 관찰하기 위해서 역전사 증합효소연쇄반응을 실시하였다. 조골

Table 4. ALPase activity(nM/ μ g/30Min)

ALP activity	1 day	6 day
EMD200	1,459 \pm 0,786	3,149 \pm 0,438*
EMD100	1,554 \pm 0,012	6,043 \pm 0,961*
EMD50	1,405 \pm 1,001	2,782 \pm 1,570
EMD25	1,176 \pm 0,364	1,071 \pm 0,252
BMP200	1,187 \pm 0,627	3,563 \pm 1,284*
BMP100	0,971 \pm 0,513	6,945 \pm 1,486*
BMP50	0,892 \pm 0,385	1,800 \pm 0,428
BMP25	0,702 \pm 0,786	1,945 \pm 1,375
Control	0,778 \pm 0,400	1,702 \pm 1,025

*: Statistically significant as compared with 1 day ($P < 0.05$)

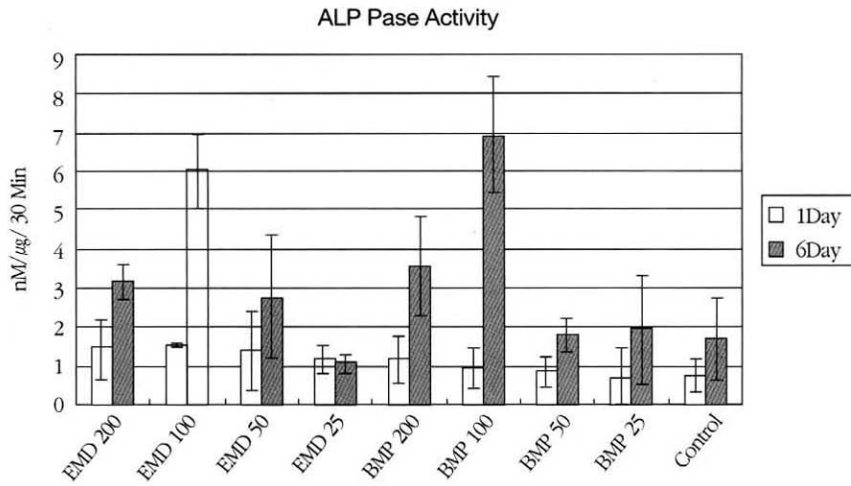


Figure 2. Alkaline phosphatase activity(nM/µg/30Min)

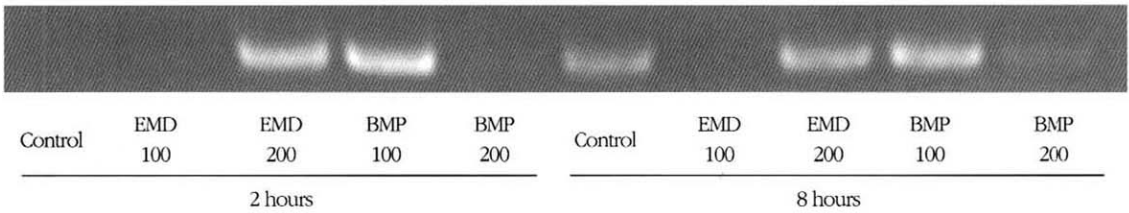


Figure 3. Effect on the mRNA expression of Collagen type 1 at 2 hours and 8 hours culture.

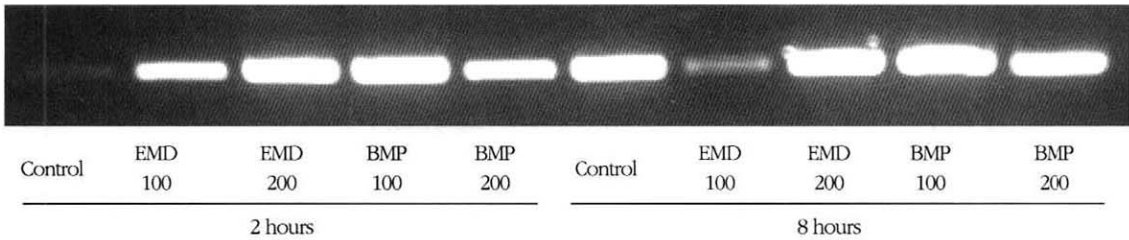


Figure 4. Effect on the mRNA expression of alkaline phosphatase at 2 hours and 8 hours culture.

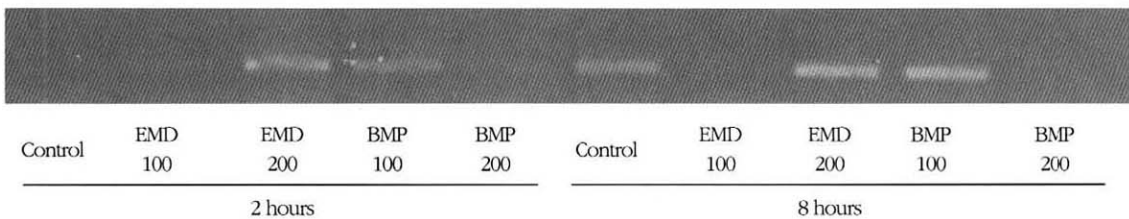


Figure 5. Effect on the mRNA expression of BMP-2 at 2 hours and 8 hours culture.

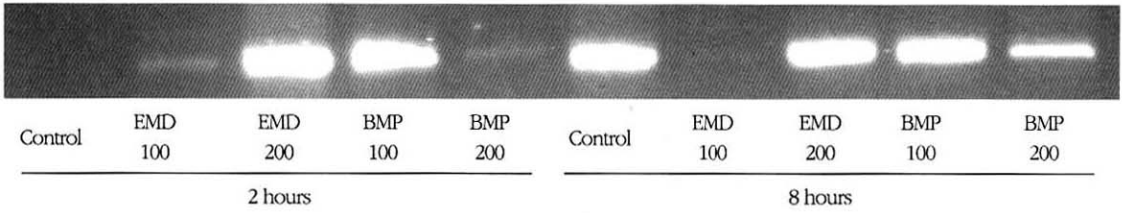


Figure 6. Effect on the mRNA expression of osteopontin at 2 hours and 8 hours culture.

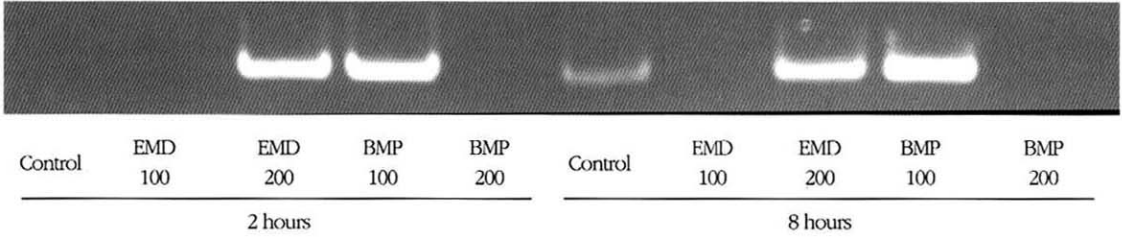


Figure 7. Effect on the mRNA expression of bone sialoprotein at 2 hours and 8 hours culture.

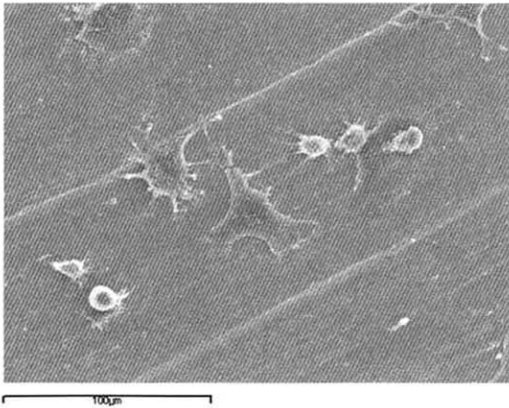


Figure 8. Control Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x500)

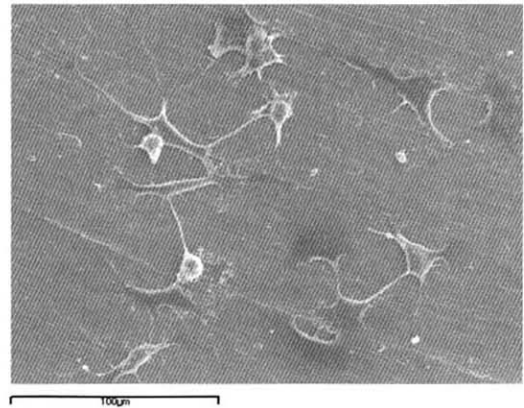


Figure 9. BMP(25ng/ml)-coated Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x500)

세포의 특이적 표지자중의 대표적인 Type I collagen의 mRNA 발현은 배양 2시간 후의 관찰에서는 EMD200, BMP100군 및 BMP200 처리군에서 발현되었고 BMP200군에서 상대적으로 약하게 보였다. 배양 8시간째 관찰에서는 EMD100군을 제외한 모든 군에서 발현이 되었다(Figure 3). 알칼리성인산분해효소의 mRNA 발현은 2시간, 8시간에서 모든 군에서 발현되었다(Figure 4). 조골세포의 분화를 촉진시키

는 대표적 성장인자인 bone morphogenic protein-2 (BMP-2)의 mRNA 발현은 배양 후 2시간에서 EMD200 군, BMP100 군, BMP200 군에서 나타났으며, BMP200 군에서 아주 약하게 발현되었다. 8시간 배양 후의 발현은 control 군, EMD200 군, BMP100 군에서 발현되는 양상을 보였다(Figure 5). 조골세포의 분화에 직접 관계되는 비콜라겐성 골단백질의 특이적 유전자인 osteopontin은 배양 후 2시간에서

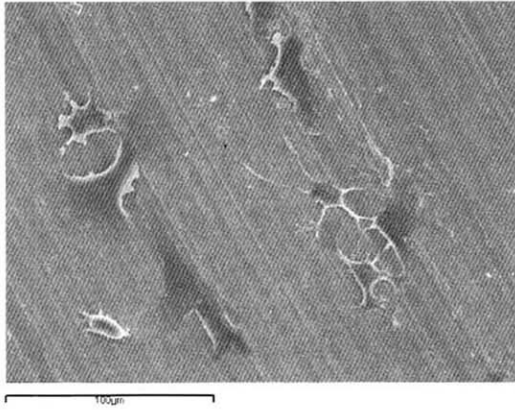


Figure 10. BMP(50ng/ml)-coated Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x 500)

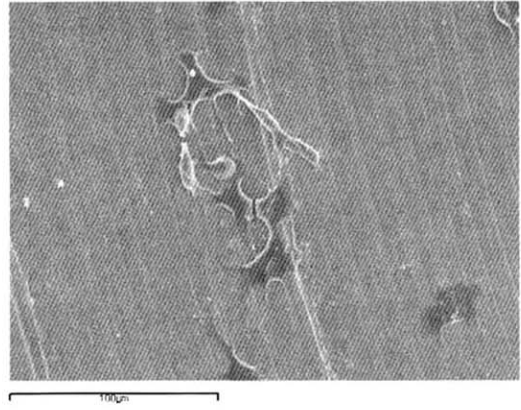


Figure 11. BMP(100ng/ml)-coated Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x 500)

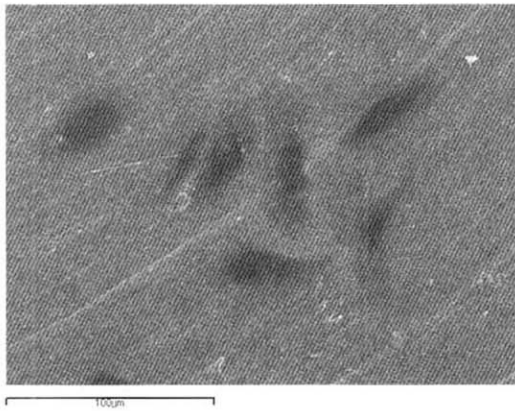


Figure 12. BMP(200ng/ml)-coated Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x 500)

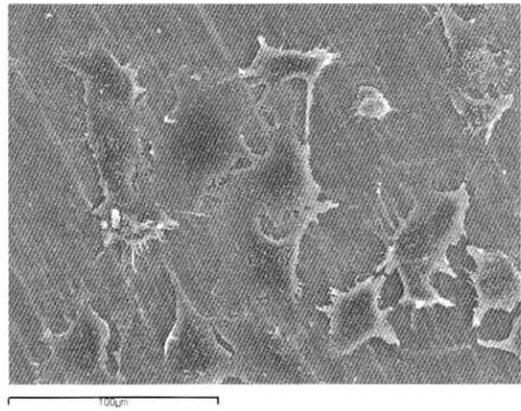


Figure 13. EMD(25µg/ml)-coated Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x 500)

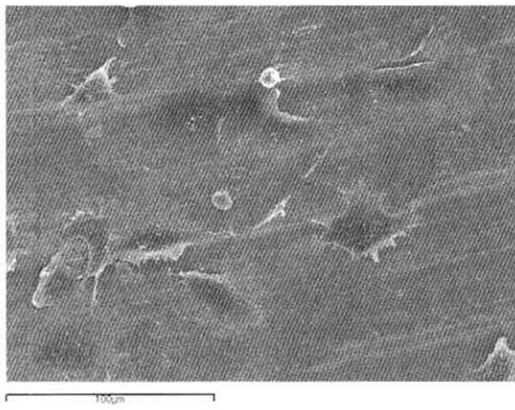


Figure 14. EMD(50µg/ml)-coated Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x 500)

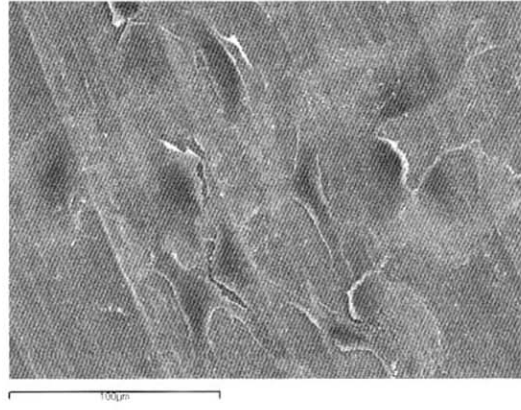


Figure 15. EMD(100µg/ml)-coated Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x 500)

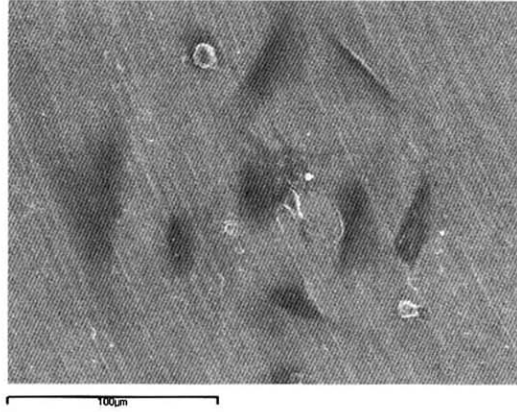


Figure 16. EMD(200 $\mu\text{g/ml}$)-coated Titanium disk taken by Scanning Electron Microscopy (x 500)

EMD100, EMD200 처리군과 BMP100, BMP200 처리군에서 강하게 발현하였으며, 8시간후 모든군에서 발현되었지만 상대적으로 EMD100군에서 약하게 발현되었다(Figure 6). 조골세포의 분화의 중기 단계의 표지자인 bone sialoprotein (BSP)은 배양후 2시간에서 EMD200군과 BMP100 처리군에서 유사하게 나타났으며, 8시간 후 발현은 control 군, EMD200, BMP100군에서 발현되었다(Figure 7).

4. 세포-시편 혼합체의 주사전자현미경적 관찰

BMP가 피복된 군에 부착된 Saos-2 세포는 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 꼬리(tail)가 잘 발달된 뚜렷한 방추형 모양의 세포가 관찰되었으며, 이와는 대조적으로 EMD 처리군에서는 부착된 세포가 더욱 편평하고 둥근모양이 관찰되었다. 한편 농도의 변화에 따른 부착세포의 형태가 농도가 높아짐에 따라 더 잘 부착되는 양상을 보였다(Figure 8-16).

VI. 고안

Hertwing 상피근초(HERS)가 치근의 상아질을 형성한 후 끊어지는 것은 전구백악아세포가 치근면에 강하게 이주하고, 이들이 백악아세포로 분화하는 동안 상아질면과 내측상피세포사이를 관통하기 때문

인 것으로 주장되고 있다. 이와같이 HERS의 상피세포들은 치아유두(dental papilla)와 치아낭(dental follicle)에 영향을 주어서 이들 내부에 존재하는 간엽세포들이 각각 조상아세포와 백악아세포로 분화하도록 유도하여 치근의 상아질과 백악질을 형성하도록 유도한다. 이러한 상피-간엽 상호작용에는 화학유도물질이 관여하는데 이들은 세포기질이나 내측 기저막에서 분비되어 이와 관련된 수용체와 결합하고 세포내에서 신호체가 되어서 간엽세포의 분화를 유도하게 된다. 이러한 화학유도물질에 대한 연구에서 Inoue 등¹¹⁾은 탈회상아기질이 연골형성을 유도했다고 보고했다. 범랑기질단백질이 백악질 형성과정에서 이러한 화학유도물질로 작용할 것으로 추측되던 중 1997년에 Hammarström¹²⁾은 치아낭의 간엽세포가 범랑기질에 노출되면 무세포성 경조직이 범랑질 표면에 형성되는 것을 관찰했고, 범랑기질의 주성분인 amelogenin이 치근형성과정에서 나타나는 것을 관찰했다. Gestrelus 등¹³⁾은 범랑기질유도체를 Propylene glycol alginate체에 용해시켜서 적용시킨 첫 주 동안 섬유아세포양세포의 재 군집을 촉진하는 것을 관찰했다. 또한, Gestrelus 등¹⁴⁾은 범랑기질유도체가 시험관에서 치주인대세포의 증식을 돕고, 치주인대세포에 의한 단백질 합성량을 증가시킴으로써 조직재생부위에서 세포의 친화성 기질로 작용한다고 주장하였다. Hammarström 등³⁾은 원숭이의 협

측 열개형 골결손부에 범랑기질유도체를 적용시 치근 상아질면에 단단히 부착된 무세포백악질의 형성을 관찰했고, 신생골도 형성되었다고 보고했다. Heijl¹⁵⁾은 인체의 하악전치 순측 열개형 결손부에 범랑기질유도체를 적용후 4개월 후 조직학적으로 관찰한 결과 신생 무세포성 백악질과 신생골이 형성되었다고 보고했다.

Heijl 등⁷⁾의 임상연구에서 치은바리수술만을 시행한 대조군에서는 방사선학적 골수준의 변화가 없는 반면, 범랑기질유도체의 적용부위의 방사선학적 골수준은 3년간 계속 증가하였다고 보고하였으며, Zetterström 등⁸⁾도 유사한 결과를 보고했다.

차폐막을 이용한 조직유도재생술에서 창상부위로 이주하는 치주인대세포는 창상부위하방의 제한된 영역에 있는 치주인대에서 유래하는데, 이것이 창상부위에 군집하기 위해서는 지속적인 분열에 의해 기저부에서부터 서서히 채워지게 된다. 반면, 범랑기질 유도체를 창상부위에 이식하면 결손부위를 채운 범랑기질유도체가 치주재생에 관여하는 세포의 이주에 매개체 역할을 하므로 여러 방향에서 세포가 이주하게 되어 보다 짧은 기간 내에 창상부위에 군집할 수 있을 것이라 사료된다.

Jiang 등¹⁶⁾은 상피근초의 세포에서 분비되는 범랑기질 유도체는 저농도보다 고농도에서 조골세포를 오래 생존하게 한다고 보고했다. 이는 조골세포가 오래 남아 조직 재생에 기여할 수 있게 한다. Jiang 등¹⁷⁾은 다른 연구에서 범랑기질유도체의 조골세포에 대한 유전자 발현을 관찰했는데 collagen I, interleukin-6와 PGHS-2 발현을 증가시키나, osteocalcin과 IGF-1의 표현을 자극하지 않는다고 했다. 범랑기질유도체는 murine follicular SVF 세포들과 쥐의 성숙한 조골세포의 콜라겐 mRNA 표현을 유발했다^{17,18)}. Miho 등¹⁹⁾은 쥐의 대퇴골에 타이태늄 임플란트를 매식하면서 범랑기질유도체를 사용하여 결과를 관찰하였는데 골소주의 형성이 많이 나타났으며 bone sialoprotein의 증가를 보인다고 했다. 세포증식 실험에서는 음성 대조군에 비교하여 EMD, BMP 두 실험군에서 더 많은 세포의 수를 보여 주었으며 주사전자현미경상에서도 더 잘 부착되어 있는 양상

을 보였다. 범랑기질유도체를 사용시 타이태늄 표면의 조골세포의 증식과 부착에 영향을 미치는 것으로 보인다.

골성 세포분화의 단계들은 골기질 단백질의 발현을 보임이 보고되어 왔다. 조골세포의 초기분화단계에서 Collagen type I이 최대로 발현되고 기질 성숙 단계에서 alkaline phosphatase가 최대로 발현된다²⁰⁾. 후기 분화단계로 가면서 osteopontin, osteocalcin, bone sialo protein 등이 발현된다. Bone sialo protein은 산성이고, 인산화된 당단백질이며 hydroxyapatite생성을 촉진시킨다. Osteopontin의 mRNA는 biphasic pattern으로 발현된다. osteopontin은 60 kd의 o-phosphoserine를 함유한 산성 당단백질이며 골 조직에서 세포외기질의 광화와 세포의 분화에 중요한 역할을 하는 몇 개의 calcium binding sites를 가진 것으로 추정된다²¹⁾. Osteopontin, bone sialoprotein은 백악질 형성과 조골세포 분화, 골광화에 있어 중요한 기능을 담당한다. 역전사효소-중합효소연쇄반응의 결과에서 기질 성숙 단계에서 최대로 발현되는 alkaline phosphatase의 mRNA 발현은 배양 2시간, 배양 8시간째 관찰에서 모든 군에서 발현이 증가하였다. 이는 Saos-2 세포의 알칼리성인산분해효소의 활성이 높은 세포임을 보여준다. 초기분화단계에 나타나는 Type I collagen의 mRNA 발현은 배양 2시간 후의 관찰에서는 EMD200, BMP100군 및 BMP200 처리군에서 발현되었고 BMP200군에서 상대적으로 약하게 보였다. 배양 8시간째 관찰에서는 EMD100군을 제외한 모든 군에서 발현이 되었다. 2001년 Jiang 등²²⁾이 범랑기질유도체는 murine follicular SVF 세포들과 쥐의 성숙한 조골세포의 콜라겐 mRNA 표현을 유발했다는 결과와 같은 결과를 보였다. 조골세포의 분화의 중기 단계의 표지자인 bone sialoprotein은 배양후 2시간에서 EMD200군과 BMP100 처리군에서 유사하게 나타났으며, 8시간 후 발현은 control 군, EMD200, BMP100군에서 발현되었다. 이는 Miho 등¹⁹⁾의 쥐의 대퇴골에 타이태늄 임플란트를 매식하면서 범랑기질유도체를 사용하여 결과를 관찰하였을 때 골소주의 형성이 많이 나타났으며 bone sialoprotein의 증가를 보인다는 결과와 같은 결과를 보였다.

2000년 Tokiyasu 등²³⁾은 범랑기질유도체는 osteocalcin의 표현을 하향 조정하고, osteopontin의 발현을 촉진 하지만 백악아세포에서 광화를 저해했다고 보고했는데 백악아세포의 효과와같이 본 실험에서도 조골세포의 범랑기질유도체의 효과 중 osteopontin의 mRNA 표현은 강하게 발현하였다. Casati 등²⁴⁾은 개의 하악에 임플란트를 매식한후 인위적으로 만든 협측 dehiscence 결손부에 범랑기질유도체를 단독으로 혹은 골조직유도체재생술과 병행하여 사용시 유의성있는 차이는 없었지만 조직유도 재생술 보다는 골조직유도체재생술과 범랑기질유도체를 동시에 사용시 유의성있는 차이를 보인다고 했다. 이 실험에서는 범랑기질유도체의 치주인대세포등에 대한 영향을 배제하고 조골세포의 영향을 보고자 한 것이다.

본 실험의 결과는 범랑기질유도체가 피복된 타이태늄에서 배양된 조골세포에 범랑기질유도체가 분화 및 증식에 미치는 효과는 알칼리성인산분해효소의 활성도와 골형성관련 특이단백질의 mRNA 발현함을 보이고 있고 조골세포의 분화 및 증식을 촉진함을 보여주는 것으로 임플란트 매식시나 매식체 주위염시 치료에 사용이 가능할 것으로 여겨지나 초기의 현상만을 본 것이어서 좀 더 장기적인 연구가 요구되며 농도에 따른 효과의 관찰이 필요하다고 사료된다.

VI. 결론

이 연구에서는 타이태늄 표면에 범랑기질유도체로 처리시 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 관찰하고자 했다. 골조직 재생효과가 확인된 BMP-2 세포수준의 작용과 범랑기질유도체의 효과를 비교 평가 하고자 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 효과를 알칼리성인산분해효소의 활성도와 alkaline phosphatase, osteopontin, bone sialoprotein 등 골형성관련 특이단백질들의 mRNA 발현을 통해 알아보하고자 하였다.

1. 배양후 6일에서 EMD100 $\mu\text{g/ml}$ 군이 EMD50, 200

$\mu\text{g/ml}$ 의 두 군보다 유의성 있게 세포수가 많았고 음성대조군과 비교시 EMD25, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 군과 BMP100, 200ng/ml군은 유의성이 있게 높았으며, 1일보다 6일에서는 모든 군에서 유의성이 있게 높았다($p < 0.05$).

2. EMD100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 BMP100, 200ng/ml 군에서 1일보다 6일에서 alkaline phosphatase 활성도가 유의성이 있게 높았다($p < 0.05$).
3. EMD군과 BMP군 모두 농도가 높을수록 세포가 타이태늄 디스크에 더 잘 부착되어 있는 양상을 보였다.
4. 역전사효소-중합효소연쇄반응의 결과에서 alkaline phosphatase, collagen type I, osteopontin, bone sialoprotein, BMP-2는 2시간, 8시간에서 EMD200 $\mu\text{g/ml}$ 군 BMP 100ng/ml군에서 mRNA를 발현함을 보였다.
5. 역전사효소-중합효소연쇄반응의 결과에서 alkaline phosphatase와 osteopontin은 거의 모든 군에서 발현되었다

본 실험의 결과는 범랑기질유도체가 피복된 타이태늄에서 배양된 조골세포에 범랑기질유도체가 분화 및 증식에 미치는 효과는 알칼리성인산분해효소의 활성도와 골형성관련 특이단백질의 mRNA 발현함을 보이고 있고 이는 골조직 재생의 측면에서 rhBMP-2와 같이 조골세포의 분화 및 증식을 촉진함을 보여주는 것이지만 초기의 현상을 본 것이어서 좀 더 장기적인 관찰이 요구된다.

VII. 참고문헌

1. Garrett S. Periodontal regeneration around natural teeth. Ann Periodontol 1996;1:62-666.
2. Hirooka H. The biologic concept for the use of enamel matrix protein: True periodontal regeneration. Quintessence Int 1998; 29:621-630.
3. Hammarström L; Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel

- matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997;24:669-677.
4. Silvestri M, Ricci G, Rasperini G, Sartori S, Cattaneo V. Comparison of treatments of infrabony defects with enamel matrix derivative, guided tissue regeneration with a non-resorbable membrane and Widman modified flap. A pilot study. *J Clin Periodontol* 2000; 27:603-610.
 5. Zucchelli G, Bernardi F, Montebugnoli L, De Sanctis M. Enamel matrix proteins and guided tissue regeneration with titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of infrabony defects: A comparative controlled clinical trial. *J Periodontol* 2002; 73:3-12.
 6. Froum SJ, Weinberg MA, Rosenberg E, Tarnow D. A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: A 12-month re-entry study. *J Periodontol* 2001;72:25-34.
 7. Heijl L, Heden G, Svördström G, Östgren A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1997; 24:705-714.
 8. Zetterström O, Andersson C, Eriksson L, et al. Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1997;24:697-704.
 9. Pontoriero R, Wennström J, Lindhe J. The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol* 1999;26: 833-840.
 10. Okuda K, Momose M, Miyazaki A, et al. Enamel matrix derivative in the treatment of human intrabony osseous defects. *J Periodontol* 2000;71:1821-1828.
 11. Inoue T, Deporter DE, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix *in vivo* and *in vitro*. *J Dent Res* 1986;65:12-22
 12. Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 1997; 24:658-668.
 13. Gestrelus S, Andersson C, Johansson A-C, et al. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol* 1997;24: 678 -684.
 14. Gestrelus S, Andersson C, Lidström D, Hammarström L, Somerman M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 1997;24: 685-692.
 15. Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol* 1997;24:693
 16. Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Enamel matrix derivative prolongs primary osteoblast growth. *J Endod* 2001;27:110-112.
 17. Jiang J, Fouad AF, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Effects of enamel matrix derivative on gene expression of primary osteoblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:95-100.
 18. Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells *in vitro*. *J Periodontol* 2001;72: 679-687.
 19. Shimizu-Ishiura M, Tanaka S, Lee WS, Debari K, Sasaki T. Effects of enamel matrix derivative to titanium implantation in rat femurs. *J Biomed Mater Res* 2002;60:269-276.
 20. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in

- vitro : reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-430.
21. Glimcher MJ. Role of collagen and phosphoproteins in the calcification of bone and other collagenous tissues. IN: Rubin RP, Weiss GB, Putney JW. eds. *Calcium in Biological Systems*, pp 607-616, Plenum Press, New York, 1987.
 22. Van der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V, Beertsen W. 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.
 23. Tokiyasu Y, Takata T, Saygin E, Somerman M. Enamel factors regulate expression of genes associated with cementoblasts. *J Periodontol* 2000 ;71:1829-1839.
 24. Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, Caffesse RG, Sallum AW. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* 2002 ;73 : 789-96

Effects of enamel matrix derivative and titanium on the proliferation and differentiation of osteoblasts

Sang-Hyun Park¹, In-Kyeong Lee¹, Seung-Min Yang², Seung-Yun Shin¹, Yong-Moo Lee¹,
Young Ku¹, In-Chul Rhyu¹, Chong-Pyoung Chung¹, Soo-Boo Han¹, Sang-Mook Choi¹

¹Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

²Department of Dentistry, College of Medicine, Sung Kyun Kwan University

Among objectives of periodontal therapy, the principal one is the morphological and functional reconstruction of lost periodontal supporting tissues. This includes de novo formation of connective tissue attachment and the regrowth of alveolar bone. The use of enamel matrix derivative(EMD) may be a suitable means of regeneration new periodontal attachment in the infrabony defects. Implant used to replace lost tooth but, implantitis occurred after installation. The purpose of this study was to investigate the effects of EMD on differentiation and growth of osteoblast in titanium disc.

Twentyfive millimeter diameter and 1mm thick Ti disc which was coated 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of EMD(Emdogain®) used as experimental group, 25, 50, 100, 200ng/ml of rhBMP-2 as positive control group, and no coat as negative control group. A human osteosarcoma cell line Saos-2 was cultured in Ti disc and cell proliferation and Alkaline phosphatase (ALP) activity were measured at 1 and 6 days. PCR was performed at 2 and 8 hours. Semi-quantitative RT-PCR for mRNA expressions of various osteoblastic differentiation markers - type I collagen, ALP, osteopontin, and bone sialoprotein - were performed at appropriate concentrations based upon the results of MTT and ALP assay. Cultured cell-disc complexes were prepared for scanning electron microscopy (SEM) at 2 hour. Data were analyzed using Mann-Whitney and repeated- measures 1-way analysis of variance(SPSS software version 10,SPSS, Chicago, IL).

After culture, there was more osteoblast in EMD100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ than in EMD50, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ on day 6. There was significant difference in experimental and positive control group compared control group, as times go by(1 and 6 days). Alkaline phosphatase activity was different significantly in EMD100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and BMP100, 200ng/ml on day 6. The results of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) showed that expression of mRNA for ALPase, collagen type I, osteopontin, bone sialoprotein and BMP-2 was detected at 2 hour and 8 hour in EMD200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ subgroup and BMP100ng/ml subgroup.

The results of this study suggest that application of enamel matrix derivative on osteoblast attached to titanium surface facilitate the expression of bone specific protein and the differentiation and growth of osteoblast.